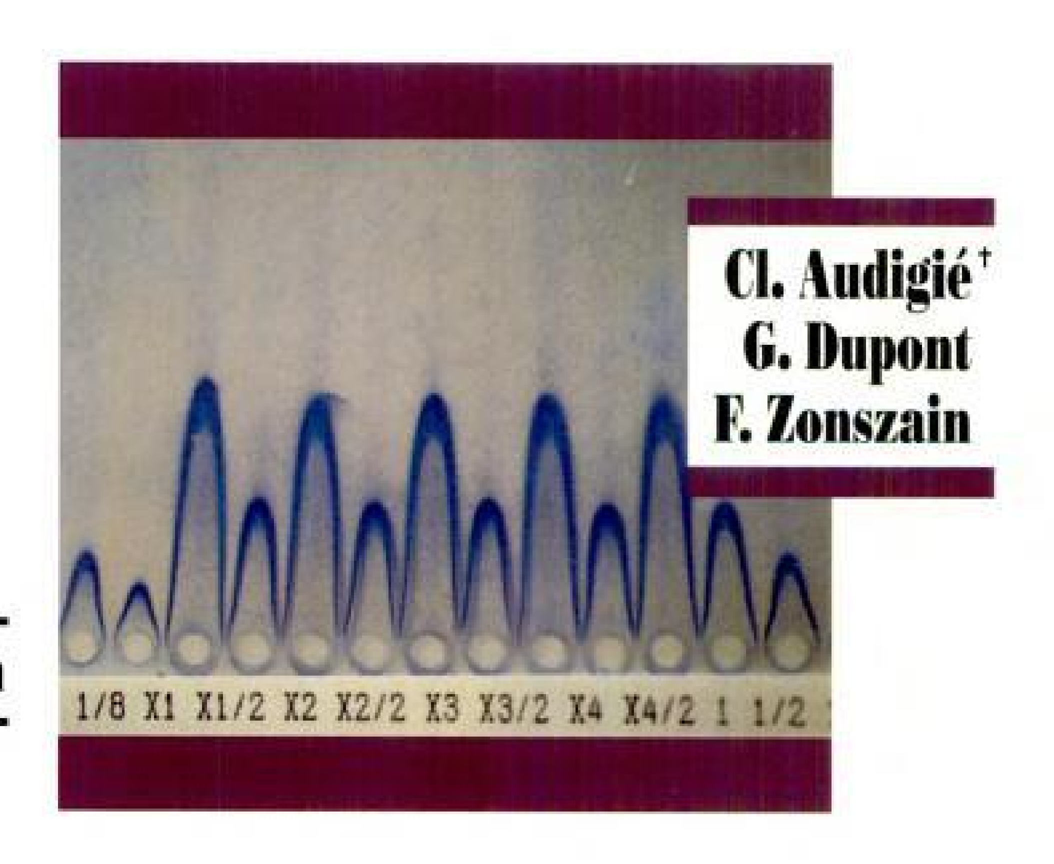
BIOSCIENCES ET TECHNIQUES
collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Principes des méthodes d'analyse biochimique

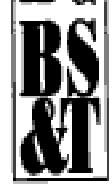
Tome 2



Cl. Audigié†
G. Dupont
F. Zonszain

nouvelle édition

doin



BIOSCIENCES ET TECHNIQUES
Collection dirigée par J. Figarella, F. Zonszain

Principes des méthodes d'analyse biochimique

Tome 2

Cl. Audigié †

G. Dupont

Professeur agrégé de sciences physiques, mathématiques spéciales P, Lycée Le Rondeau, Boisfleury, La Tronche

F. Zonszain

Professeur agrégé à l'école nationale de chimie, physique et biologie de Paris

nouvelle édition

doin éditeurs - paris

CHEZ LE MÊME ÉDITEUR

Principes des méthodes d'analyse biochimique,
par C. AUDIGIÉ, G. DUPONT, F. ZONSZAIN, tome 1, 1985 ; tome 2, 3ᵉ édition, 1992.

Biochimie structurale,
par C. AUDIGIÉ, F. ZONSZAIN, 2ᵉ édition, 1991.

Biochimie métabolique,
par C. AUDIGIÉ, F. ZONSZAIN, 1988.

Hématologie. Aspects théoriques et pratiques,
par M. CHARRIN, P. VANNESTE, 1991.

Génie enzymatique,
par G. COUTOULY, 1991.

Travaux dirigés de biochimie,
par G. COUTOULY, E. KLEIN, E. MEYER, 2ᵉ édition, 1991.

Génie fermentaire,
par F. DENEUVILLE, 1991.

Manipulations d'analyse biochimique,
par M. GAVRILOVIC, M.-J. MAGINOT, C. SCHWARTZ-GAVRILOVIC, J. WALLACH, 1992.

Principes de base en biotechnologie,
par M. GOURGAUD-LARPENT, J.-J. SANGLIER, 1992.

Microbiologie générale,
par H. LECLERC et coll., 1988.

Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments,
par H. LECLERC, D. A. A. MOSSEL, 1989.

Génie enzymatique. Travaux pratiques,
par D. LONCLE, 1992.

Le laboratoire de bactériologie,
par N. MARCHAL, J.-L. BOURDON, F. BIMET, 1988.

Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries,
par N. MARCHAL, J.-L. BOURDON, C. RICHARD, 4ᵉ édition, 1991.

Cours de microbiologie générale,
par A. MEYER, J. DEIANA, H. LECLERC, 3ᵉ édition, 1991.

Bactériologie médicale et vétérinaire,
par Ch. PILET, J.-L. BOURDON, N. MARCHAL, B. TOMA, C. BALBASTRE, J.-M. PERSON, 1987.

Q.C.M. de chimie-biochimie,
par J. WALLACH, 1986.

DOIN ÉDITEURS
1, avenue Edouard-Belin
92856 Rueil-Malmaison

ISBN 2-7040-0684-9

3ᵉ édition

imprimé en France

TABLE DES MATIÈRES

I

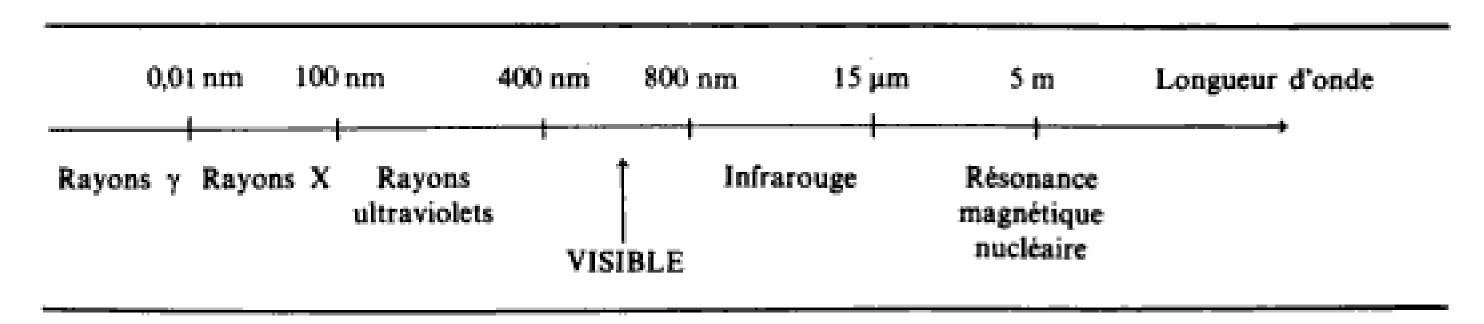
MÉTHODES SPECTRALES

Nous avons décrit dans le tome 1 (cf. chap. III, III.1) les différents éléments physiques utilisés dans les photomètres et les spectrophotomètres, ainsi que les techniques de spectroscopie d'émission, d'absorption moléculaire visible et la photométrie des milieux troubles.

Nous étudions, dans le présent chapitre, les méthodes d'analyse un peu plus sophistiquées, basées sur l'étude des spectres (variation du flux énergétique émis ou absorbé en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence). La plupart des techniques envisagées font appel à des radiations électromagnétiques. Le tableau 1 résume l'ensemble des radiations que l'on utilisera.

L'émission dans le visible a été étudiée dans le tome 1. L'émission ou l'absorption de rayons γ sera envisagée dans le chapitre III avec les autres types de radioactivité.

Tableau 1 *Radiations utilisées en spectrométrie.*



I.1. L'absorption moléculaire

Lorsqu'un faisceau de radiations monochromatiques (fréquence ν) pénètre dans un milieu matériel solide, liquide ou gazeux, les molécules constituant ce milieu peuvent absorber une partie du rayonnement. Pour que cette absorption ait lieu, il faut que l'énergie des photons ($h\nu$) soit égale à la différence d'énergie correspondant à une transition possible entre deux niveaux de la molécule. Il est donc nécessaire de préciser comment sont répartis les niveaux énergétiques d'une molécule et d'en déduire les interactions possibles avec le rayonnement. Nous étudierons ensuite l'absorption ultraviolette (l'absorption visible étant développée dans le tome 1) et l'absorption infrarouge.

1. L'énergie des molécules

L'énergie d'une molécule comporte plusieurs parties, quantifiées :

– *énergie électronique :* les électrons des atomes constituant la molécule sont répartis dans des orbitales moléculaires d'énergie bien définie ;

– *énergie de vibration :* les atomes liés par des liaisons de covalence, vibrent les uns par rapport aux autres comme s'ils étaient unis par de petits ressorts : leur énergie ne peut prendre qu'une suite discontinue de valeurs ;

– *énergie de rotation :* l'ensemble d'une molécule peut tourner dans l'espace ; les mouvements correspondants font intervenir une énergie, également quantifiée, l'énergie de rotation ;

– *énergie nucléaire :* en présence d'un champ magnétique, les noyaux de certains atomes (H par exemple) vont subir des interactions, qui font apparaître un autre type d'énergie. Nous étudierons ce phénomène, la *résonance magnétique nucléaire,* dans la partie I.4 de ce chapitre.

1.1. ÉNERGIE ÉLECTRONIQUE DES MOLÉCULES

Les *atomes,* isolés, ont une énergie électronique que nous avons étudiée dans le tome 1, avec la technique de l'émission atomique.

Une théorie simple permet d'expliquer la formation des *molécules* à partir des orbitales atomiques : c'est la méthode appelée *CLOA, combinaison linéaire des orbitales atomiques.* La mécanique quantique montre, en effet, que la combinaison linéaire des orbitales atomiques permet d'obtenir les orbitales moléculaires. Cette combinaison peut se réaliser de deux façons. A partir d'un niveau énergétique donné d'une orbitale atomique, il peut alors se produire :

– un abaissement de l'énergie, avec formation d'une orbitale moléculaire dite « liante » ;
– une augmentation de l'énergie, avec formation d'une orbitale moléculaire dite « antiliante ».

La succession des niveaux énergétiques ainsi obtenus constitue le diagramme des orbitales moléculaires. On donne ci-après trois exemples simples pour illustrer cette méthode.

1.1.1. CAS DE L'HYDROGÈNE

L'atome d'hydrogène comporte une orbitale 1*s*. La combinaison des orbitales 1*s* de deux atomes (atome *a* et atome *b*) donne une orbitale à symétrie axiale appelée σ (sigma) ; deux niveaux d'énergie sont alors possibles (fig. 1), σ et σ^* correspondant aux orbitales liantes et antiliantes.

Chaque orbitale comporte un électron (qu'on représente par une flèche pour symboliser son spin). Dans la molécule, les électrons occupent, dans l'état fondamental, le niveau d'énergie le plus bas, c'est-à-dire celui de l'orbitale liante σ_{1s}.

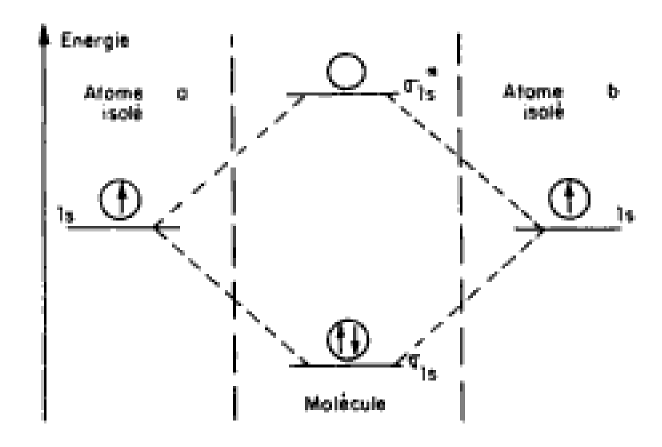


Fig. 1 Orbitales moléculaires de l'hydrogène.

L'orbitale σ^*_{1s}, antiliante, est donc inoccupée, dans l'état fondamental. Une excitation de la molécule peut provoquer une transition des électrons de l'orbitale σ_{1s} à l'orbitale σ^*_{1s}.

1.1.2. CAS DE L'OXYGÈNE

On ne s'occupe que des électrons externes des atomes, $2s^2$ et $2p^4$. La combinaison des orbitales p peut se réaliser de deux façons :

– suivant l'axe des orbitales; il se forme alors une orbitale à symétrie axiale, σ; on retrouve, comme dans le cas de l'hydrogène, les deux niveaux possibles σ et σ^* (fig. 2);

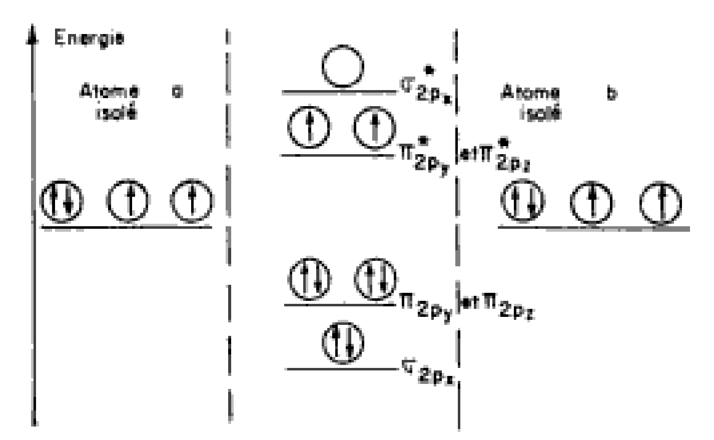


Fig. 2 Orbitales moléculaires de l'oxygène.

– suivant une direction perpendiculaire à l'axe; il se forme alors des orbitales π; on obtient deux niveaux énergétiques, π, liant et π^*, antiliant.

Chaque atome d'oxygène comportant quatre électrons externes, les huit électrons vont occuper successivement les différents niveaux, dans l'ordre d'énergie croissante. L'orbitale σ^*_{2px} reste donc vide.

1.1.3. CAS DE HCl

On rencontre, dans la molécule de HCl, un troisième type d'orbitale, qui ne va pas subir de combinaison au cours de la formation de la molécule. Les électrons appartenant à ces orbitales ne participent pas à la liaison; ils sont appelés *non liants* (fig. 3).

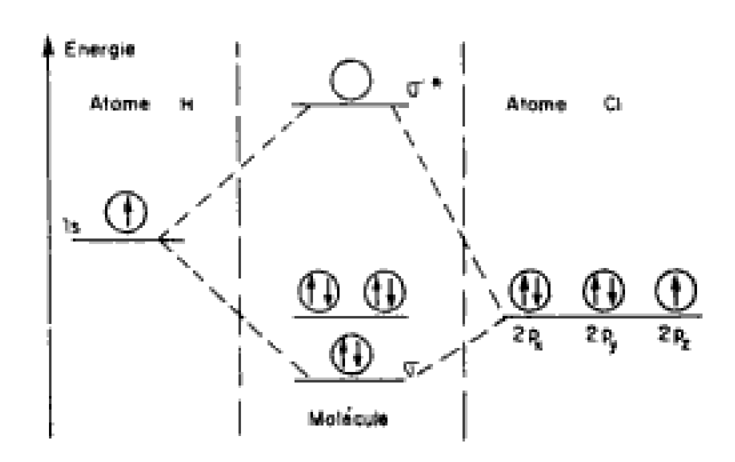


Fig. 3 Orbitales moléculaires de HCl.

Il faut remarquer, également, dans ce cas, que les niveaux des orbitales atomiques sont à une hauteur différente, car H et Cl n'ont pas la même électronégativité et la liaison est polarisée.

1.2. ÉNERGIE DE VIBRATION DES MOLÉCULES

1.2.1. MODÈLE SIMPLE : LE RESSORT

La liaison, qui existe entre deux atomes A et B, est analogue à celle qui est due à un ressort, lequel exerce une force de rappel lorsque A et B ont tendance à s'éloigner (fig. 4). Cette force intervient si A et B s'éloignent et si A et B se rapprochent trop l'un de l'autre. Il s'établit une position d'équilibre stable, autour de laquelle les atomes ont un mouvement vibratoire, par suite de l'agitation thermique.

La fréquence des vibrations, ν_0, peut être

calculée par la mécanique classique :

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}},$$

relation dans laquelle k est la constante de raideur du ressort et μ la masse réduite donnée par la relation :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_A} + \frac{1}{m_B}.$$

L'ensemble des deux corps A et B possède une énergie potentielle, qui varie selon la distance, r, entre A et B :

$$E_{pot} = 1/2\,k(r - r_0)^2 \quad \text{(fig. 5)}.$$

La position d'équilibre stable correspond au minimum d'énergie potentielle ; il lui est associée la valeur r_0 de la distance entre A et B.

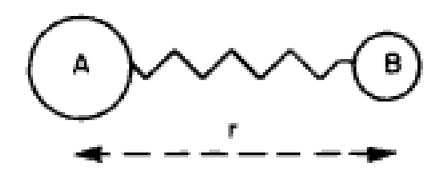


Fig. 4 Modèle du ressort.

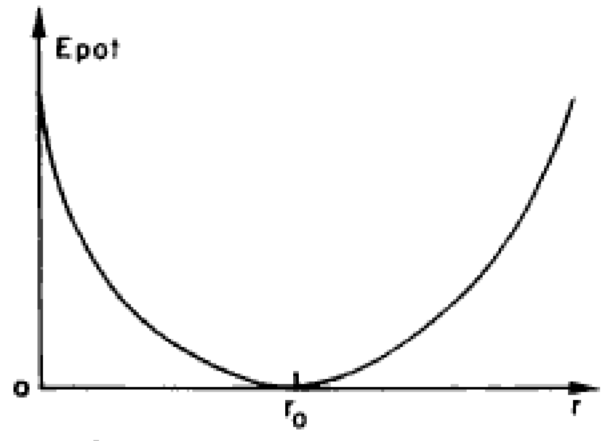


Fig. 5 Énergie du ressort.

1.2.2. CORRECTIONS AU MODÈLE CLASSIQUE : LA MOLÉCULE

Les corrections sont les suivantes :

– on utilise une origine différente pour l'énergie potentielle. E = 0 lorsque la liaison n'existe plus, c'est-à-dire lorsque A et B ne sont plus liés. La molécule correspond donc à une énergie négative, lorsque A et B sont liés ;

– à la compression, les électrons des atomes se repoussent et l'augmentation d'énergie potentielle est plus rapide que dans le cas du ressort. La courbe n'est donc plus symétrique (fig. 6).

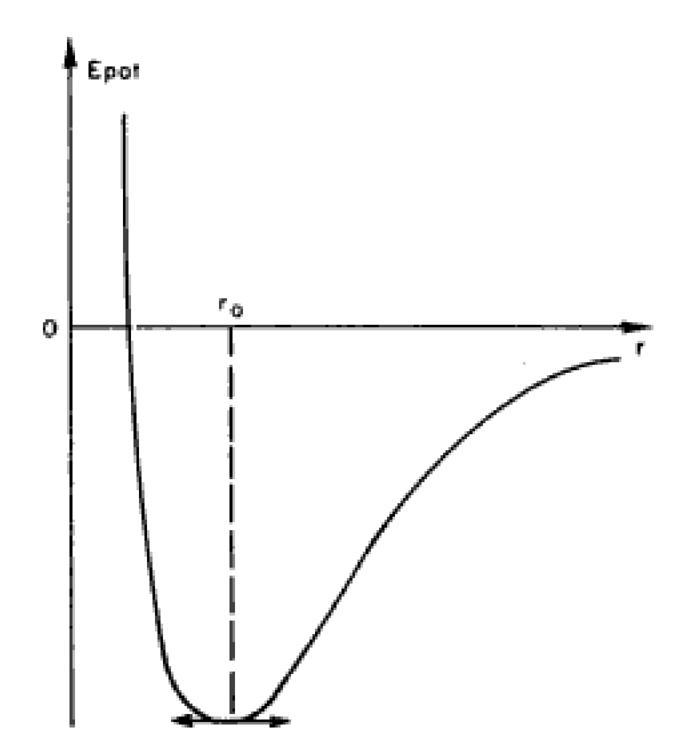


Fig. 6 Énergie de la molécule A-B.

– la mécanique quantique montre que la liaison ne peut exister que dans quelques « états énergétiques » bien définis. La molécule comporte donc des niveaux d'énergie de vibration :

$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2}\right)h\nu_0$$

où v est le nombre quantique de vibration et ν_0 la fréquence de vibration de la liaison. Les différents niveaux d'énergie obtenus sont équidistants (fig. 7). On retrouve un tel diagramme pour chacune des liaisons rencon-

trées dans une molécule et pour chacun des états d'énergie électronique.

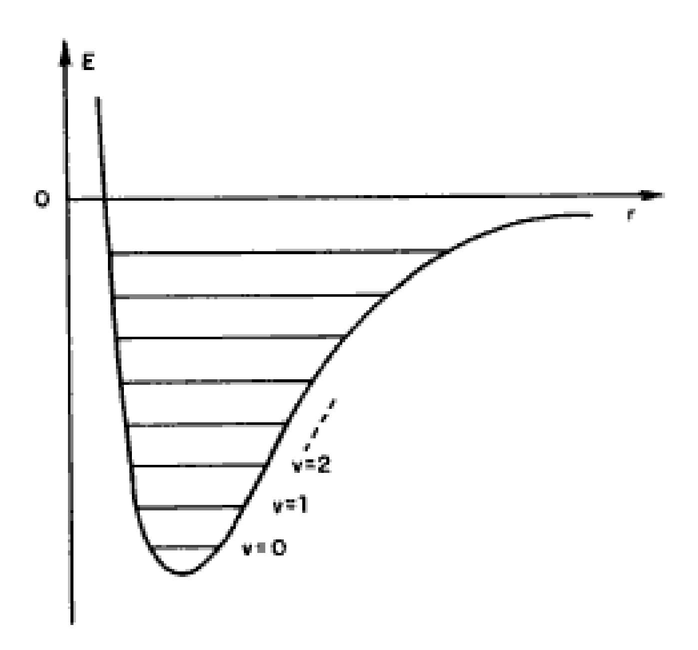


Fig. 7 États de vibration d'une molécule (pour un état électronique donné).

1.2.3. CAS DES MOLÉCULES POLYATOMIQUES

L'étude que l'on vient de faire s'applique à un mode de vibration particulier, qui traduit l'allongement de la liaison.

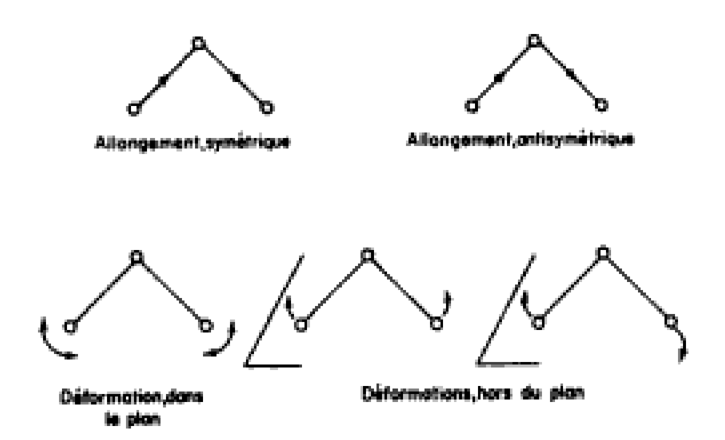


Fig. 8 Différents modes de vibration d'une molécule triatomique : allongement (« stretching ») et déformation (« bending »).

Si on considère une molécule triatomique, on doit étudier d'autres modes de vibration :

– vibration *d'allongement* des liaisons, symétriques ou antisymétriques ;

– vibrations de *déformation*, dans le plan ou hors du plan de la molécule. La figure 8 représente ces différentes vibrations.

1.3. ÉNERGIE DE ROTATION

La molécule peut tourner autour d'axes de rotation tels que Δ (fig. 9) avec une vitesse angulaire ω. Elle acquiert une énergie cinétique de rotation :

$$E_{rot} = 1/2\, I\omega^2$$

où I représente le moment d'inertie de la molécule par rapport à l'axe considéré. I peut se calculer à partir de la masse réduite : $I = \mu . r^2$.

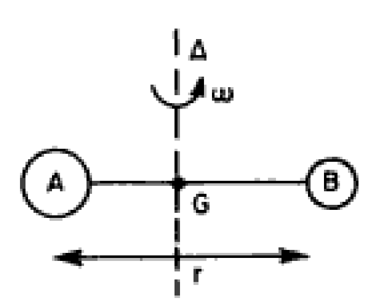


Fig. 9 Rotation d'une molécule.

La mécanique quantique montre que la molécule ne peut acquérir n'importe quelle vitesse de rotation. Il s'introduit un nombre quantique de rotation J et l'énergie cinétique de rotation est quantifiée :

$$E_{rot} = J(J+1)\frac{h^2}{8\pi^2 I}.$$

Les niveaux d'énergie s'éloignent les uns des autres au fur et à mesure que le nombre quantique J augmente.

1.4. TRANSITIONS ÉNERGÉTIQUES

Il se produit une transition énergétique lorsque la molécule est excitée et lorsque son état énergétique passe sur un niveau plus élevé. Si cette excitation est produite par un photon, celui-ci est absorbé par la molécule. Il faut, pour cela, que $h\nu = \Delta E$, où $h\nu$ est l'énergie du photon, et ΔE l'énergie correspondant à la transition énergétique.

1.4.1. DOMAINES CORRESPONDANT AUX DIFFÉRENTES TRANSITIONS

Le tableau 2 rassemble ces différents domaines.

1.4.2. EXEMPLE DE TRANSITION

Les spectres de rotation pure ne seront pas étudiés dans cet ouvrage ; ils n'offrent que peu d'intérêt pour l'analyse biochimique.

Nous montrons, figure 10, deux transitions énergétiques qui ont lieu dans l'ultraviolet (ou le visible) et dans l'infrarouge. Ainsi sont représentés deux états d'énergie électronique d'une molécule et les différents états de vibration correspondants.

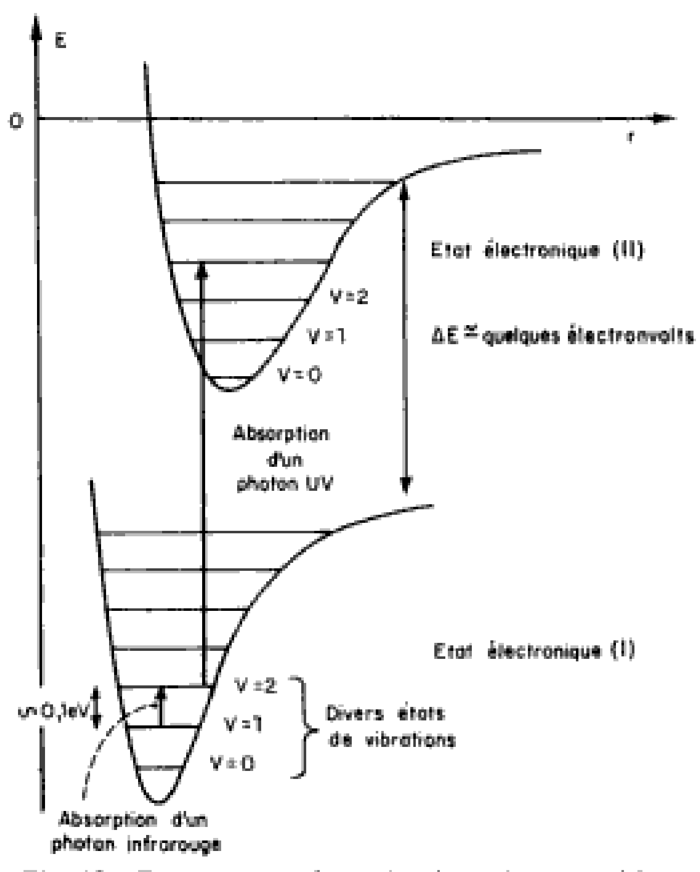


Fig. 10 Deux exemples simples de transition : absorption d'une photon ultraviolet et d'un photon infrarouge.

Un rayonnement ultraviolet ou visible ne peut provoquer que des transitions d'énergie électronique (état I à état II).

Tableau 2 *Résumé des transitions « optiques ».*

Rayonnement	*Ultraviolet*	*Visible*	*Infrarouge* proche	*Infrarouge* lointain
Transitions énergétiques	États électroniques ΔE ≃ quelques électron-volts		États de vibrations et de rotations ΔE ≃ 0,1 eV	États de rotations pures ΔE ≃ 0,05 eV
Longueurs d'onde	100 à 400 nm	400 à 800 nm	1 à 15 μm	

Les atomes ayant une inertie supérieure à celle des électrons, une transition électronique se produit sans variation de la distance *r* entre les atomes A et B de la molécule. On représente donc une telle transition par un segment vertical.

Un rayonnement proche infrarouge ne peut provoquer qu'une transition entre deux états de vibration ($v = 2$ à $v = 3$, par exemple).

Nous n'avons représenté que des transitions produites par absorption de rayonnement ; on trouvera dans les chapitres suivants des transitions produites par émission de rayonnement.

2. Absorption ultraviolette

2.1. GÉNÉRALITÉS

Les transitions entre des niveaux d'énergie électronique (cf. I.1, 1) correspondent à des radiations situées dans le visible et l'ultraviolet.

Nous avons développé, dans le tome 1, la spectrophotométrie visible. Nous étudierons, dans ce paragraphe, uniquement la spectrométrie ultraviolette.

2.1.1. DOMAINE DE LONGUEUR D'ONDE

L'échelle suivante représente le domaine de longueur d'onde utilisé en spectrométrie ultraviolette :

Lointain ultraviolet	Ultraviolet « courant »	Visible	
160	210	400	λ(nm)

Le lointain ultraviolet (160 nm < λ < 210 nm) correspond à un domaine où l'oxygène absorbe fortement les radiations; son utilisation demande donc des précautions : mesures faites en absence d'air, sous vide.

2.1.2. TRANSITIONS ÉLECTRONIQUES

Souvent, les molécules, qui absorbent dans ce domaine, sont complexes et formées de nombreuses liaisons. On peut cependant expliquer l'allure d'un spectre d'absorption par un diagramme énergétique simple (fig. 11).

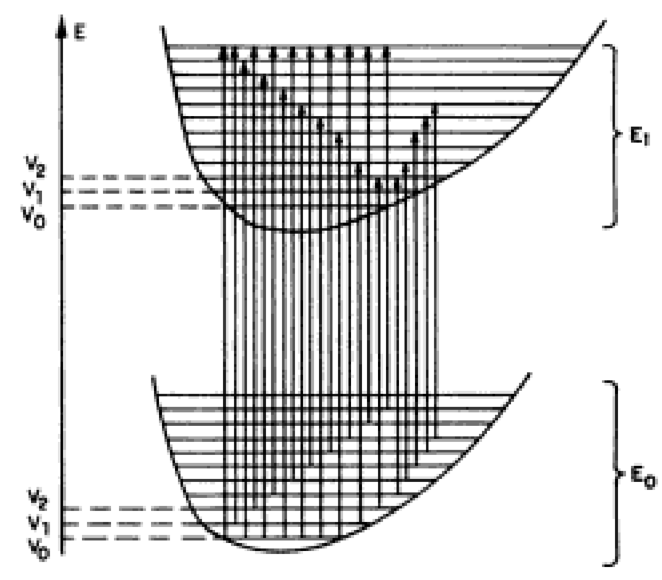


Fig. 11 Transitions énergétiques possibles par absorption ultraviolette.

On schématise un niveau d'énergie électronique de la molécule par une courbe qui rappelle le diagramme énergétique relatif à *une liaison*. En l'absence d'excitation, les molécules possèdent l'énergie E_0. Dans cet état électronique, elles peuvent avoir différents états de vibration. Chaque énergie de vibration possible correspond aux niveaux V_0, V_1, V_2 ...

L'absorption d'un rayonnement se traduira par toutes les transitions schématisées sur la figure 11 et l'on remarque le grand nombre de

possibilités, d'énergie très voisine. L'ensemble de toutes ces longueurs d'onde, voisines, qui seront absorbées, forme un spectre de *bandes larges* et non un spectre de bandes étroites comme on trouve en infrarouge (cf. I.1, 3), La figure 12 montre la différence d'allure de ces spectres.

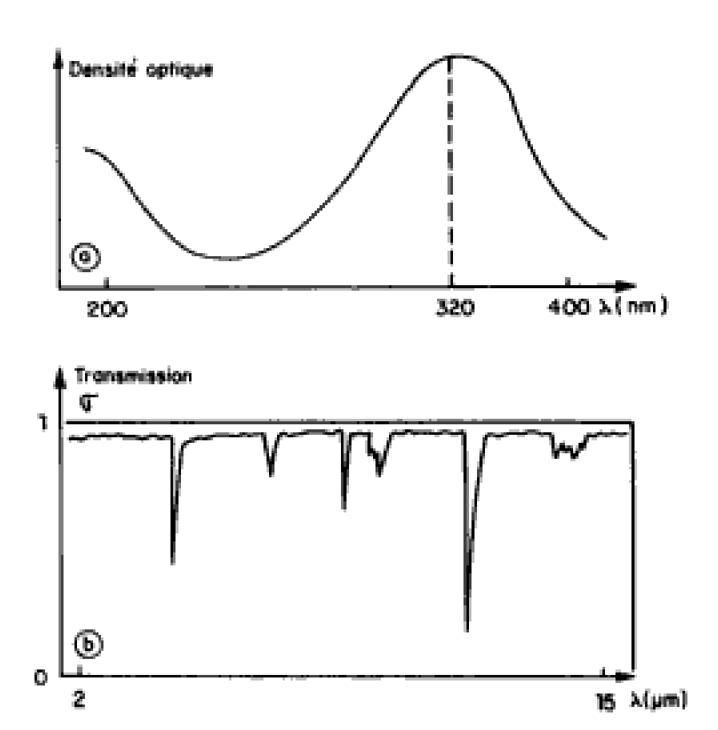


Fig. 12 Comparaison d'un spectre d'absorption : *a*) Ultraviolet (spectre de bandes larges). *b*) Infrarouge (spectre de bandes étroites).

2.2. APPAREILLAGE

On distingue les appareils qui permettent de tracer un spectre ultraviolet (ou visible), avec enregistrement, et ceux qui permettent de mesurer seulement les densités optiques, plutôt utilisés en analyse quantitative. Leur principe est le même que celui qui a été décrit dans le tome 1, en spectrophotométrie visible. Nous rappellerons, ici, le principe des spectrophotomètres à double faisceau.

La figure 13 représente le schéma d'un tel appareil, destiné au tracé des spectres d'absorption ultraviolet ou visible. A partir du rayonnement émis par la source, on obtient un faisceau monochromatique de longueur d'onde variable, au moyen d'un double monochromateur, à prisme et à réseau. Le faisceau monochromatique est alors séparé en deux à l'aide d'un dispositif tournant. Un tel dispositif est successivement miroir, lame transparente ou écran ; lorsqu'il est miroir, le faisceau (2) traverse la cellule contenant l'échantillon ; lorsqu'il devient lame transparente, il transmet le faisceau (1) qui traverse la cellule de référence pouvant contenir le solvant ou le blanc ; s'il est écran, il permet au système électronique de comparer le flux des deux faisceaux précédents et d'imposer au stylet de l'enregistreur un déplacement proportionnel à leur différence.

Les appareils dont on se sert en ultraviolet ou visible utilisent plutôt un système électronique qu'un atténuateur optique comme on en rencontre dans les appareils infrarouges.

2.2.1. SOURCES DE RAYONNEMENT

Dans le visible, on se sert de lampes à filament de tungstène, avec éventuellement cycle à halogène, permettant d'obtenir des températures plus élevées (3 200 K) et un meilleur rendement lumineux.

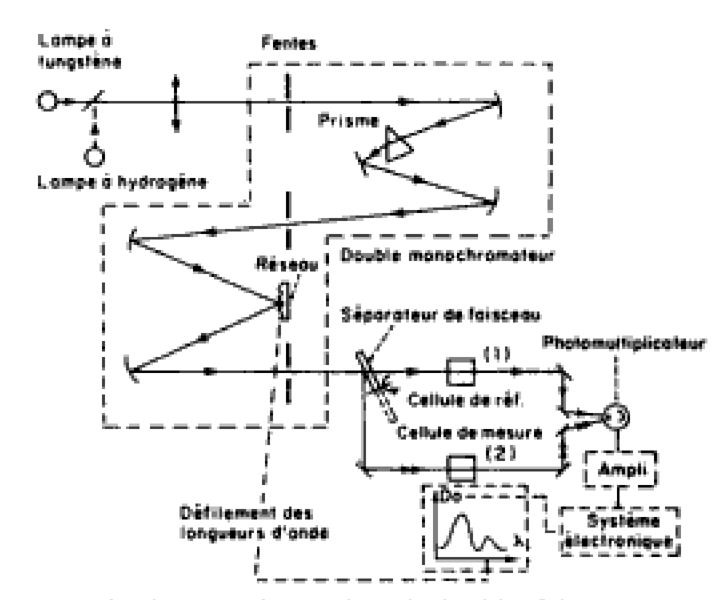


Fig. 13 Spectrophotomètre à double faisceau.

Dans l'ultraviolet, on utilise couramment des lampes à hydrogène ou à deutérium (D_2), avec enveloppe en quartz. Ces lampes fournissent un spectre continu, ultraviolet, jusqu'à 375 nm et discontinu dans le visible. Un système, en général, permet de changer de source vers 360 nm pour passer de l'ultraviolet au visible.

2.2.2. SYSTÈME DISPERSIF

Les appareils les plus employés utilisent des réseaux. Pour éviter le chevauchement des différents ordres de diffraction, on leur adjoint, en général, soit des filtres, soit des prismes à faible résolution (fig. 13).

2.3. APPLICATIONS ANALYTIQUES

2.3.1. ANALYSE QUALITATIVE

Les molécules complexes ont une absorption qui est la somme des absorptions des différents groupements qui la constituent. Un certain nombre de groupements sont responsables d'une absorption intense dans le domaine visible ou ultraviolet : on les appelle *chromophores*. Il en existe d'autres qui, placés au voisinage d'un chromophore, en font varier l'absorption, alors qu'eux-mêmes n'absorbent pas directement dans le domaine envisagé ; on les appelle *auxochromes* (exemple : allyle, amine...). Le tableau 3 indique les principaux chromophores et leurs transitions correspondantes.

Les hydrocarbures saturés n'absorbent pas dans le domaine ultraviolet et visible et peuvent donc être utilisés comme solvant, de même que l'eau.

Lorsque deux doubles liaisons (électrons π) ou une double liaison et un doublet libre (électrons n) ne sont séparés que par une seule simple liaison, on dit qu'ils sont *conjugués*. La conjugaison augmente la longueur d'onde d'absorption, elle exerce un effet *bathochrome*. Si le nombre de doubles liaisons devient suffisant, le corps devient coloré, car l'absorption a lieu dans le visible.

Les protéines n'absorbent pas directement dans le visible ; en ultraviolet, elles donnent l'absorption caractéristique des acides aminés aromatiques et de la liaison peptidique. Seules certaines protéines, qui possèdent quelques groupements particuliers (hémoglobine) absorbent dans le visible. On peut remarquer que toutes les protéines ont un spectre semblable, avec absorption intense pour $\lambda < 220$ nm, (liaison peptidique) minimale vers 250 nm, maximale très marquée vers 280 nm (acides aminés aromatiques).

Différents facteurs peuvent modifier l'allure des spectres dans cette région : solvant, pH, température. Le solvant modifie le spectre lorsque les molécules présentes sont polaires et qu'elles interagissent par les forces de Van der Waals (en général, déplacement vers les grandes longueurs d'onde). Les variations de pH peuvent provoquer des ionisations de molécules qui modifient la répartition des électrons dans leurs orbitales. Cette influence est utilisée dans les indicateurs colorés acido-basiques, par exemple la phénolphtaléine :

Étant donné la largeur des bandes d'absorption, l'influence de solvant, du pH ..., il est difficile d'utiliser un spectre d'absorption ultraviolet ou visible pour déterminer la structure d'une molécule. Un spectre UV ou visible permet surtout de doser une substance en indiquant la longueur d'onde du maximum d'absorption et de mettre en évidence des espèces instables qui interviennent comme intermédiaires dans les réactions et qu'on ne peut pas isoler.

Tableau 3 *Principaux chromophores.*

Groupement	*Chromophore*	*Transition électronique*	*Longueur d'onde* λ (nm)	*Coefficient d'extinction* (l.mol⁻¹ cm⁻¹)
$>C=C<$	Éthylène Hexène-2	$\pi \rightarrow \pi^*$	170 185	15 800 10 000
$-C\equiv C-$	Heptyne-1	$\pi \rightarrow \pi^*$	184	2.10^3
$>C=O$	Éthanal Propanone	$n \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	278 290 279 190	8 16 15 10^2
$>C=N-OH$	Oxime de la propanone	$\pi \rightarrow \pi^*$	190	5.10^3
$-N=N-$	Azométhane	$n \rightarrow \pi^*$	340	5
$>C=C-C=C<$	Butadiène	$\pi \rightarrow \pi^*$	220	3.10^4
(benzène)	Benzène	$\pi \rightarrow \pi^*$	255	10^2
$>C=C-C(=O)-$		$\pi \rightarrow \pi^*$	215	10^4
CH_3 … $C=O$		$\pi \rightarrow \pi^*$	244	10^4

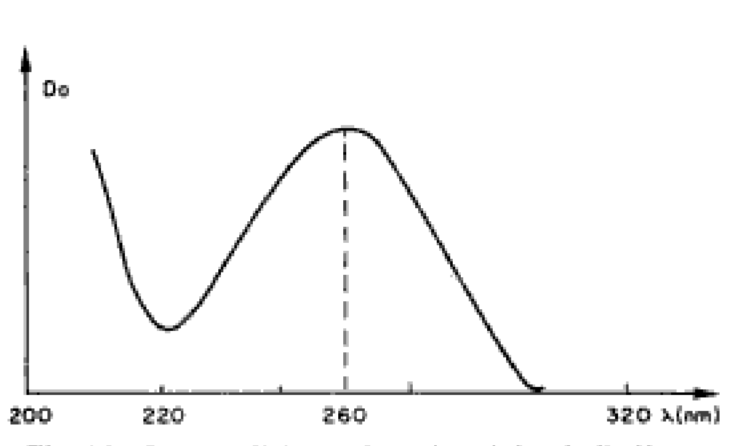


Fig. 14 Spectre d'absorption ultraviolet de l'adénosine.

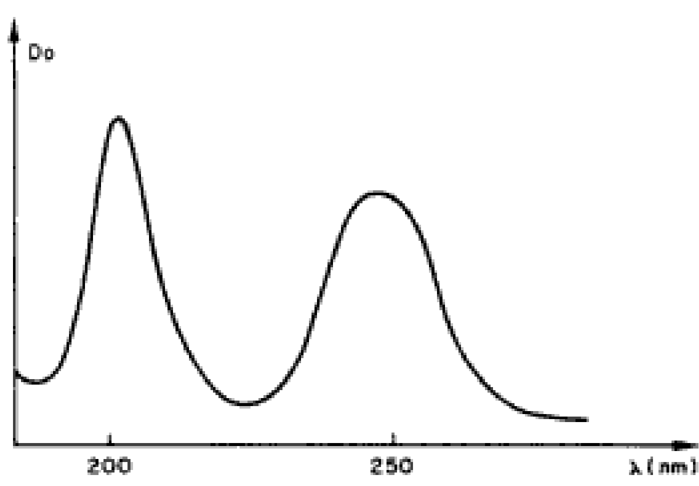


Fig. 15 Spectre d'absorption ultraviolet de l'acétophénone.

Exemples de spectre d'absorption :

La figure 14 représente le spectre d'absorption UV de l'adénosine ; la figure 15 représente celui de l'acétophénone (on trouvera fig. 20, p. 16 et fig. 61, p. 44, les spectres IR et RMN de cette même substance).

2.3.2. ANALYSE QUANTITATIVE

C'est dans le domaine ultraviolet et visible que la loi de Beer-Lambert est la plus utilisée. Les bandes d'absorption étant relativement larges, il est aisé de se placer à une longueur d'onde correspondant à une grande absorption et de mesurer la densité optique (voir la loi de Beer-Lambert, tome I, chap. III, III.1, 3.2).

L'utilisation des spectrophotomètres ultraviolets permet :

– soit de doser des substances absorbant en UV ;

– soit de doser des substances non absorbantes, en formant avec celles-ci un complexe absorbant, soluble et spécifique, sous l'influence de réactifs chimiques.

2.3.2.1. Méthode directe de dosage

On utilise directement la relation $D_0 = \varepsilon . l . c$; il faut connaître le coefficient d'absorption de la substance (ε) et caler le spectrophotomètre avec des lames étalons puisque ε varie avec la longueur d'onde.

Exemple : Dosage du NADH (fig. 16) :

$\varepsilon_{NADH, H^+} = 6{,}22 . 10^{+3}\ mol^{-1}.l.cm^{-1}$.

Fig. 16 Spectres d'absorptions du NAD^+ et NADH, H^+.

On peut ainsi mesurer l'activité d'une déshydrogénase à NADH en mesurant à 340 nm la variation de la densité optique, due à la transformation du coenzyme réduit en coenzyme oxydé.

Si on ne connaît pas exactement ε, il est nécessaire de tracer une courbe d'étalonnage $D_0 = f(c)$ avec une gamme de témoins de concentration connues, dans des conditions où la loi de Beer-Lambert est vérifiée (la méthode est la même que celle utilisée dans le visible).

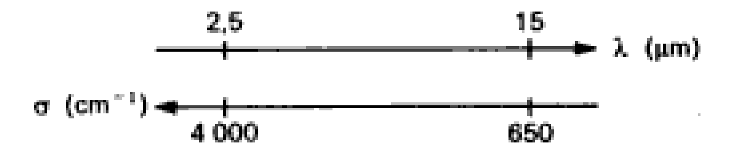
2.3.2.2. Méthodes indirectes : dosages absorptiométriques

La mesure de la variation de la densité optique d'une solution, au cours d'un dosage volumétrique, permet de déterminer le point d'équivalence du dosage. La courbe de dosage $D_0 = f(V)$, V étant le volume de réactif ajouté, est constituée de segments de droite si la dilution est négligeable. Un exemple est développé dans le tome 1, en absorption visible.

3. Absorption infrarouge

Dans le domaine infrarouge ($\lambda > 0{,}8\ \mu m$), l'absorption d'une radiation électromagnétique correspond à une transition entre des états de vibration de la molécule. Le domaine le plus utilisé est situé entre 2,5 et 15 µm. On détermine les raies d'absorption en mesurant la *transmission* du faisceau électromagnétique par la substance étudiée, en fonction du *nombre d'onde*

$\sigma = 1/\lambda$, qu'on mesure habituellement en cm^{-1} ; le domaine infrarouge prédominant est donc situé entre 650 et 4 000 cm^{-1} :



3.1. APPAREILLAGE

3.1.1. MONTAGE

On utilise habituellement le montage double faisceau (ou montage différentiel) décrit dans le tome 1, Chapitre III.

La figure 17 représente un type de montage possible : le rayonnement émis par la source est séparé en deux faisceaux ; le faisceau 1, ou faisceau de référence, ne traverse pas la substance *a* absorbante, mais un atténuateur commandé par un moteur et relié directement au dispositif d'enregistrement ; le faisceau de mesure, ou faisceau 2, traverse la substance dont on veut mesurer l'absorption. Un miroir tournant envoie, successivement et alternativement, les deux faisceaux sur le monochromateur et le dispositif de mesure de flux.

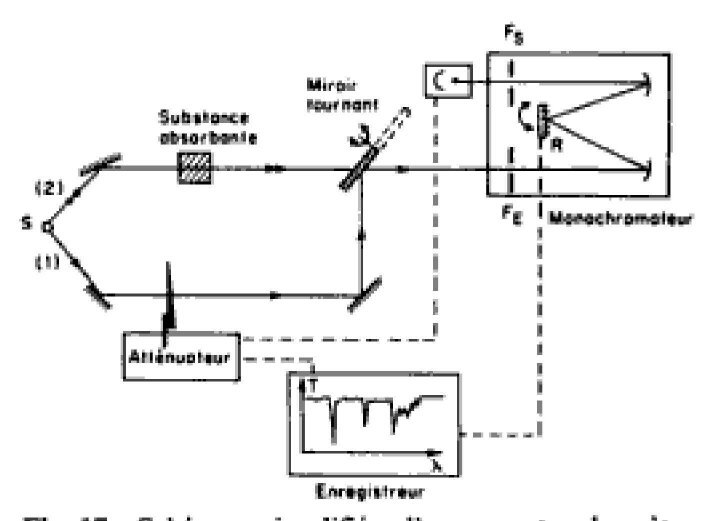


Fig. 17 Schéma simplifié d'un spectrophomètre infrarouge à double faisceau.

Si les deux faisceaux ont la même énergie, le récepteur produit un courant continu, qui n'est pas amplifié par l'amplificateur de courant alternatif de l'appareil.

Si les deux faisceaux ont une énergie différente, le signal délivré par le récepteur n'est plus continu ; il a la même fréquence que celle du miroir tournant. Ce signal, dont l'intensité est liée directement à la différence entre les énergies des deux faisceaux, est amplifié ; il commande alors un servomoteur, qui agit sur l'atténuateur du faisceau de référence, jusqu'à ce que les deux énergies soient égales.

La plume de l'enregistreur est liée à la position de l'atténuateur et traduit l'absorption de la substance au fur et à mesure que l'on fait défiler les longueurs d'onde, en faisant tourner le système dispersif.

3.1.2. SOURCE DE RAYONNEMENT

Il est nécessaire que la source émette un rayonnement dont la longueur d'onde couvre tout le domaine infrarouge utilisé (2,5 à 15 µm). Elle est formée, en général, de fils métalliques portés à incandescence par effet Joule :

– filament de tungstène (pour le proche infrarouge, jusqu'à 3 µm) ;

– lampe à filament de Nernst : formé par une petite tige réfractaire, constituée d'oxydes de zirconium, de thorium et de cérium.

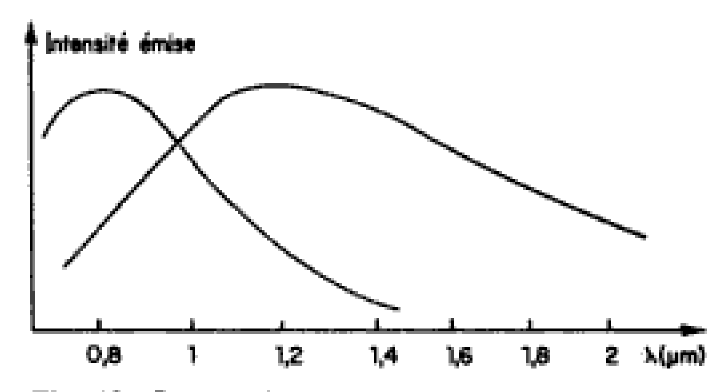


Fig. 18 Comparaison du rayonnement émis par un filament de tungstène, à deux températures différentes.

La figure 18 montre l'influence de la température sur la nature du rayonnement émis par un filament de tungstène.

3.1.3. SYSTÈME DISPERSIF

On utilise en général un réseau. Toutefois, les appareils utilisés dans le visible doivent subir de profondes modifications pour être utilisables en infrarouge. En effet, dès que la longueur d'onde dépasse 2 µm, le verre n'est plus suffisamment transparent. On peut le remplacer par de la fluorine entre 3 et 8 µm, du sel gemme entre 7 et 15 µm, mais les lentilles taillées dans les cristaux précédents seraient difficilement achromatiques. On est donc conduit à les remplacer par des miroirs concaves en métal argenté. D'où le schéma du monochromateur de la figure 17.

On fait défiler les différentes longueurs d'onde en faisant tourner le réseau autour d'un axe vertical. Pour éviter l'empiètement des différents ordres de diffraction, il est parfois nécessaire d'ajouter des filtres.

3.1.4. RÉCEPTEURS

C'est la partie délicate du spectromètre infrarouge, étant donné la faiblesse de l'énergie à mesurer.

Dans le domaine infrarouge, on utilise les effets *thermiques* du rayonnement et leurs manifestations secondaires essentiellement électriques. Les récepteurs thermiques décèlent un rayonnement infrarouge par le dégagement de chaleur qui résulte de son absorption par une surface noircie. Ils ne diffèrent que par la méthode employée pour mettre en évidence l'élévation de température obtenue.

Les deux principaux dispositifs utilisés sont la thermopile et la thermorésistance :

– *thermopile :* elle a été décrite dans le tome I (chap. III, III.1, 1.3.2.4). On rappelle que les thermopiles utilisent l'effet thermoélectrique, en faisant apparaître une différence de potentiel entre deux soudures (réalisées entre des métaux différents) dont la température est différente.

– *Thermorésistance :* c'est la variation de la résistance d'un conducteur électrique, sous l'effet d'une variation de température, qui est mise à profit pour déséquilibrer, par exemple, un pont de Wheatstone. On peut aussi mesurer simplement la tension aux bornes d'une résistance, dont la valeur varie avec la température. Cette tension peut alors être amplifiée aisément.

Pour éliminer les parasites dus à *l'émission* spontanée de rayonnement par la substance (après absorption, la substance, excitée, tend à se désactiver en émettant un rayonnement), le faisceau incident est modulé à faible fréquence (quelques Hz); un amplificateur, accordé sur cette fréquence, n'amplifiera que le signal résultant de l'énergie du faisceau qui a été modulé. Il n'amplifiera pas le signal dû au faisceau *émis.*

3.1.5. ÉCHANTILLONS

Ils peuvent présenter trois formes :

– *gazeux :* ils sont alors emprisonnés dans une cuve de chlorure de potassium;

– *liquides :* ils peuvent être soit purs, soit en solution dans le tétrachlorure de carbone, le chloroforme ou le sulfure de carbone, dans des cuves en chlorure de sodium;

– *solides :* ils se trouvent soit en suspension dans CCl_4, soit placés dans des pastilles à 1 p. 100 dans le bromure de potassium.

3.2. APPLICATIONS ANALYTIQUES

La principale application des spectres d'absorption infrarouge est l'analyse fonctionnelle et la recherche des différents groupements constituant une molécule. Pour les petites molécules renfermant peu de liaisons, les spectres d'absorption sont spécifiques de

Tableau 4 *Absorption infrarouge de quelques groupements.*

Nombre d'onde (cm^{-1}).

4 000 | 3 600 | 3 200 | 2 800 | 2 400 | 2 000 | 1 800 | 1 600 | 1 400 | 1 200 | 1 000 | 800 | 650

ALCANES : CH — CH_3, CH_2 — CH_3

ALCÈNES : 3 100 3 000 CH — C = C 1 660 1 640 — CH

si conj : doublet intense 1 600 1 660

ALCYNES :

AROMATIQUES : 3 030

ALCOOLS : 3 700 — 2 500

OH libre — OH liaisons intramol. — OH liaison interm. — OH (bande large) CHÉLATE (OH ... O=C<)

(σOH acide < σOH alcool)

OH alcool

C – O alcools phénols

I aire 1 050
II aire 1 100
III aire 1 150
phénol 1 200

CARBONYLE :

(anhydride 1 830-1 750)

• RCCl (=O) : 1 810 – 1 790
• RCOH (=O) : 1 770 – 1 750
• RCOR' (=O) : 1 745 – 1 725
• RC(=O) – H : 1 735 – 1 715
R – C(=O) – R' : 1 720 – 1 710
• RC(=O) – NH_2 : 1 700 – 1 680

La conjugaison abaisse le nb d'onde de 25 cm^{-1}.

NH :

C – N aromatique aliphatique

chacun des groupements d'atomes ; pour les molécules plus complexes, les pics peuvent se recouvrir et l'interprétation est plus difficile.

Le tableau 4 indique les nombres d'onde d'absorption de quelques liaisons. On peut distinguer quatre groupes de pics d'absorption :

– *nombres d'onde, compris entre 2 700 et 3 700 cm^{-1} :* les pics sont dus aux liaisons A – H, A pouvant être l'oxygène, l'azote ou le carbone. Dans ce domaine la position des pics dépend beaucoup de la présence de liaisons hydrogène (cas du groupement – O – H essentiellement). Une liaison hydrogène intermoléculaire provoque l'apparition d'une bande large pour des nombres d'onde inférieurs à celui d'un groupement OH libre ;

– *nombres d'onde compris entre 2 000 et 2 500 cm^{-1} :* ils décèlent la présence de liaisons triples – C ≡ C – ou – C ≡ N et également de doubles liaisons conjuguées ($\rangle$C = C$\langle$) ;

– *nombres d'onde compris entre 1 600 et 1 800 cm^{-1} :* ils indiquent la présence de doubles liaisons : $\rangle$C = C$\langle$; $\rangle$C = O ; $\rangle$C = N. Le groupement carbonyle $\rangle$C = O présente, dans cette région, une absorption très intense correspondant à des pics très étroits et caractéristiques, au voisinage de 1 700 cm^{-1} ;

– *nombres d'onde inférieurs à 1 500 cm^{-1} :* cette région est toujours complexe et difficile à interpréter.

Un spectre infrarouge permet donc d'identifier une molécule, de vérifier la pureté d'un produit, de déterminer les constantes de force des principales liaisons, de déceler la présence de liaisons hydrogène...

Exemple :

On peut comparer les spectres infrarouge de deux molécules de formules voisines : C_8H_{10} et C_8H_8O (fig. 19 et 20) (on donne par ailleurs, p. 43 et 44 les spectres RMN de ces molécules). Les formules semi-développées de ces molécules sont :

(benzène)—CH_2—CH_3 et (benzène)—$\underset{\| \atop O}{C}$—CH_3

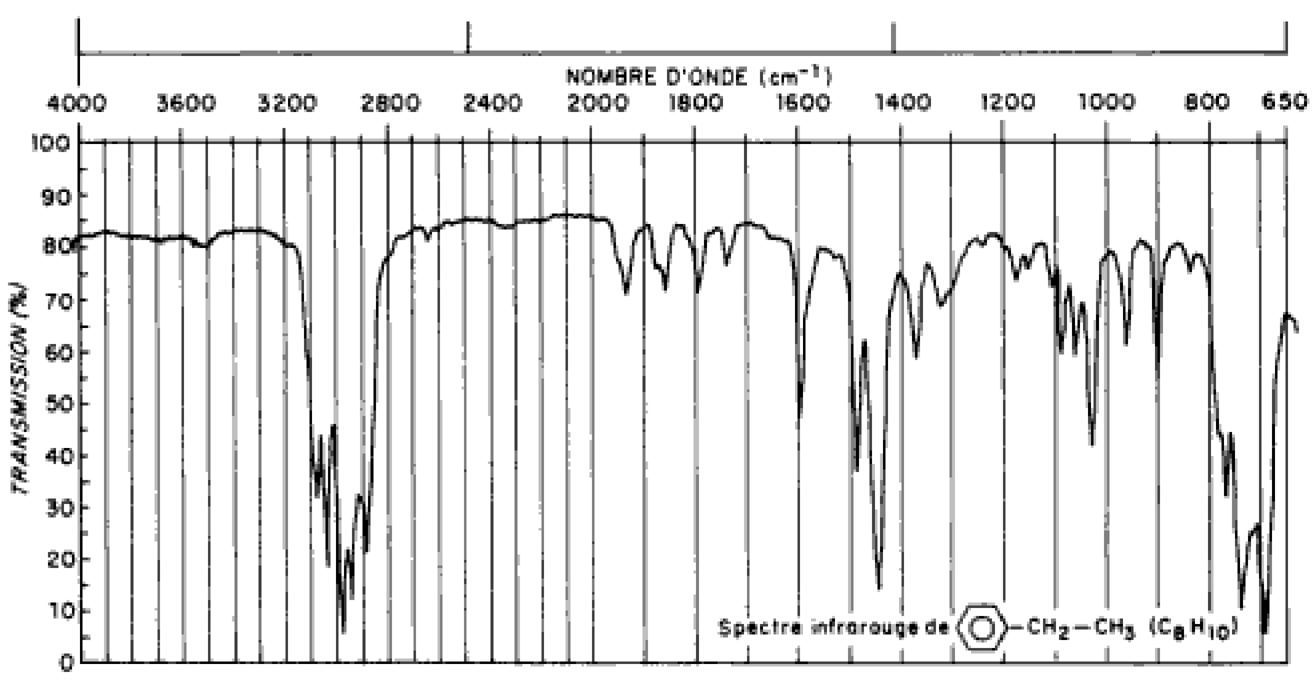


Fig. 19 Spectre infrarouge de (benzène)—CH_2—CH_3 (C_8H_{10}).

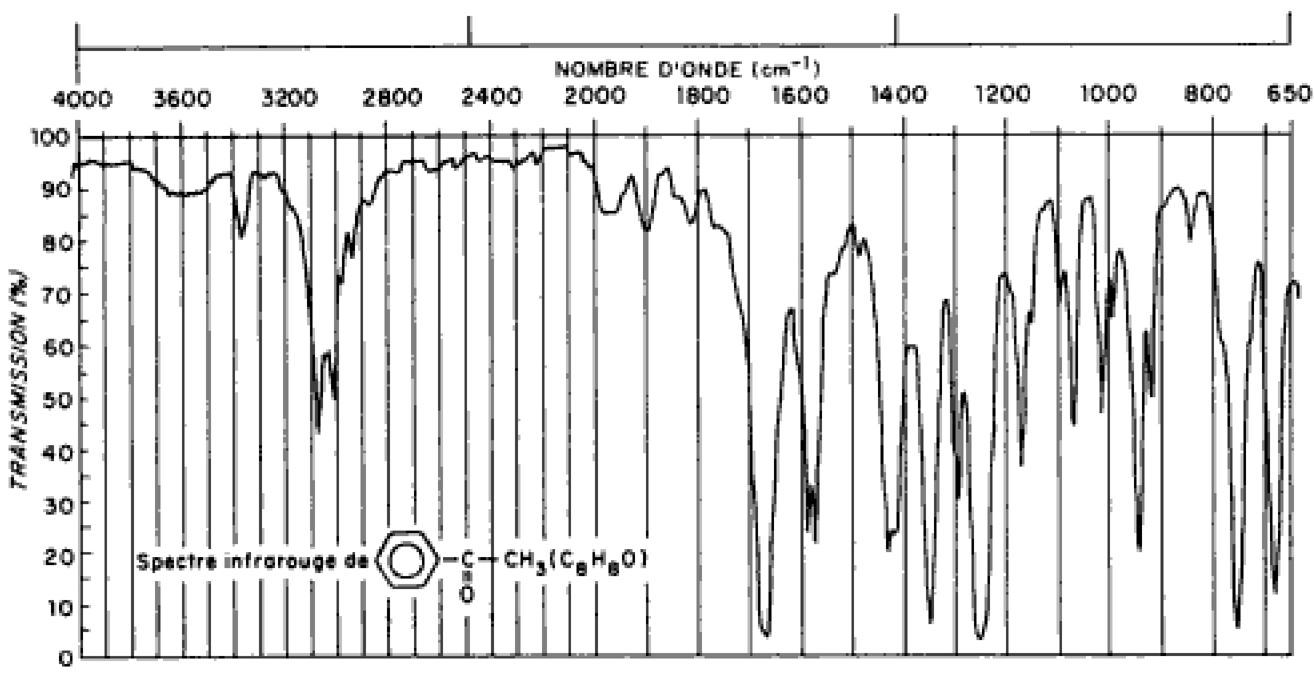


Fig. 20 Spectre infrarouge de $C_6H_5-\underset{\|}{C}(=O)-CH_3$ (C_8H_8O).

La différence la plus caractéristique est la présence, dans le spectre de la cétone de pics d'absorption spécifiques du groupement carbonyle :

$$\begin{cases} 1\,690\ cm^{-1} \\ 1\,250\text{-}1\,300\ cm^{-1}. \end{cases}$$

Le spectre de la figure 20 montre en particulier les pics caractéristiques suivants :

- C – H aromatique vers 3 030 cm^{-1} ;
- $\rangle$C = O à 1 690 cm^{-1} ;
- C – C aromatique vers 1 580 cm^{-1} ;
- CH_3 à 1 420 cm^{-1} ;
- CH aromatique à 1 300 cm^{-1} ;
- $\rangle$C = O à 1 250 cm^{-1}.

I.2. Fluorimétrie

La fluorimétrie est la technique d'analyse utilisant le phénomène de fluorescence. On appelle *fluorescence* la propriété que possèdent certaines substances d'émettre (dans toutes les directions) un rayonnement électromagnétique, lorsqu'elles sont excitées par un faisceau, lui-même électromagnétique.

L'excitation est caractérisée par une longueur d'onde λ_E, spécifique du composé étudié.

L'émission présente un spectre dont l'allure dépend de la nature physique de la substance : les atomes donnent un spectre de raies alors que les molécules donnent un spectre de bandes.

La fluorescence couvre un domaine de longueurs d'onde très étendu. La plus connue est la fluorescence moléculaire dont le spectre d'émission se situe dans le visible ou l'ultraviolet. On développe actuellement, pour l'étude des métaux « lourds », la fluorescence X, dont le spectre d'émission est formé de rayons X, de longueur d'onde inférieure à 0,2 nm *.

Les sources excitatrices sont également très variées. La plus classique est formée de radiations ultraviolettes ; on développe aussi l'utilisation de laser à colorant ayant une puissance plus grande ; pour la fluorescence X, les sources radioactives commencent à être employées.

1. Théorie de la fluorescence optique

1.1. FLUORESCENCE ATOMIQUE

L'absorption d'un photon par un atome entraîne le passage d'un électron de valence, d'une orbitale à une autre, d'énergie plus élevée. L'état excité étant instable, le retour à l'état fondamental se réalise avec émission d'un photon de fluorescence.

Il existe plusieurs types de fluorescence atomique, dont les principes sont les suivants.

1.1.1. FLUORESCENCE DE RÉSONANCE

La radiation émise possède la même longueur d'onde λ_F que la radiation excitatrice : $\lambda_E = \lambda_F$. La figure 21 montre les transitions ainsi réalisées, dans le cas du zinc, où l'on peut mettre en évidence deux radiations de fluorescence de résonance.

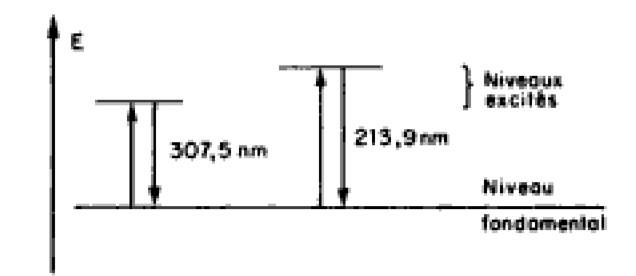


Fig. 21 Fluorescence de résonance du zinc.

Les transitions entre les deux niveaux excités n'existent pas, à cause des règles de sélection qui interdisent certaines transitions.

Un autre exemple est celui du thallium (fig. 22).

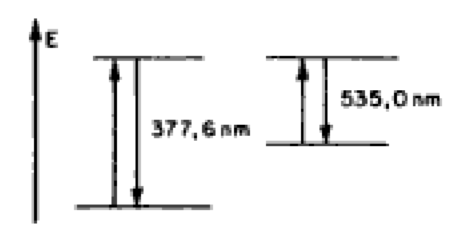


Fig. 22 Fluorescence de résonance du thallium.

* Notons également que le phénomène de fluorescence existe dans les détecteurs de radioactivité utilisant les scintillateurs (III.2, 2.5.2).

Ces transitions de résonance sont très importantes ; on les retrouve en émission atomique (excitation thermique) et en absorption atomique (excitation électromagnétique).

1.1.2. FLUORESCENCE DIRECTE ; FLUORESCENCE INDIRECTE

L'émission de résonance (cf. 1.2, 1.1.1) est alors accompagnée d'autres raies :

– transitions d'un même niveau excité vers des niveaux d'énergies différentes ; on parle de fluorescence *directe*. La figure 23 montre l'exemple de l'antimoine ;

– transitions d'un niveau inférieur au niveau d'excitation, vers le niveau fondamental ; il y a donc eu, entre-temps, une désactivation, en général non radiative. On parle ici de fluorescence *indirecte*. La figure 24 montre l'exemple du sodium.

Dans le cas du sodium, lorsque les atomes sont excités par une radiation correspondant à la raie de résonance à 330,2 nm, la fluorescence à cette longueur d'onde est accompagnée d'une fluorescence de la raie D à 589,6 et 589,0 nm.

Lorsque la fluorescence correspond à une résonance, son rayonnement peut provoquer une nouvelle excitation des atomes ; il est alors absorbé en partie. Cette atténuation, ou « quenching », est un phénomène qui diminue donc la sensibilité de la méthode. On lui préfère souvent l'analyse par émission ou par absorption atomique. On ne développera, dans la suite, que la fluorescence moléculaire.

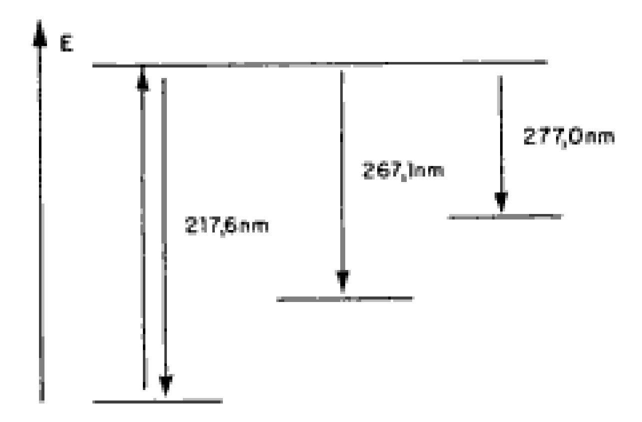


Fig. 23 Fluorescences de l'antimoine.

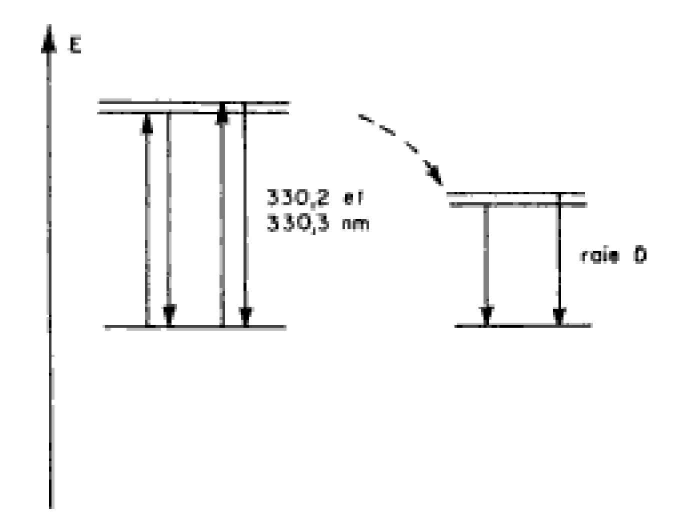


Fig. 24 Fluorescences du sodium.

1.2. FLUORESCENCE MOLÉCULAIRE

Les molécules organiques, qui présentent le phénomène de fluorescence, sont souvent des édifices complexes comprenant un grand nombre d'atomes. On peut cependant expliquer le phénomène en considérant deux états d'énergie électronique (comme pour une seule liaison) E_0 et E_1, comprenant, pour chacun d'eux, les différents états de vibration V_0, V_1, etc. (fig. 25).

L'excitation d'une molécule par un photon est un phénomène rapide, qui provoque le passage de l'état électronique fondamental E_0 à un état d'énergie supérieure E_1. L'ensemble des transitions produit l'absorption des différents photons et constitue le spectre d'excitation de la molécule (partie *a* de la figure 25).

La désactivation commence par un retour à un état vibrationnel de moindre énergie. Une telle transition (partie *b* de la figure 25) ne met pas en œuvre des photons (elle n'est pas radiative), mais en général un échange d'énergie sous forme de chaleur.

Intervient alors la désexcitation, par un retour à un état électronique d'énergie inférieure. Ce phénomène (partie *c* de la figure 25) met en œuvre un très grand nombre de transitions qui produisent, chacune, l'émission d'un photon. L'ensemble constitue le spectre d'émission du rayonnement de fluorescence.

Étant donné le grand nombre de transitions possibles, très voisines les unes des autres, on peut comprendre que le spectre d'excitation et le spectre d'émission de fluorescence auront un aspect identique, c'est-à-dire un spectre large, de bande, analogue à un spectre d'absorption ultraviolet ou visible (fig. 12).

Certains états excités ont une durée de vie plus grande (quelques millisecondes) et la désexcitation est en compétition avec des collisions (échanges thermiques), des réactions chimiques ou des émissions de rayonnement avec retard : c'est la *phosphorescence*. Cette durée de vie, plus grande pour certains niveaux excités, est utilisée de plus en plus dans les lasers (à colorant, par exemple) qui permettent d'obtenir un rayonnement de longueur d'onde variable (cf. tome 1, chap. III.1, 2.2).

Fig. 25 Fluorescence moléculaire.

2. Fluorimétrie moléculaire

Comme pour les appareils utilisant le phénomène d'absorption, on distingue :

– les fluorimètres à filtre, qui permettent une sélection *discontinue* des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence par un couple de filtres ;

– les spectrofluorimètres, à double monochromateur, permettant une sélection *continue* des longueurs d'onde.

L'ensemble des appareils utilise le faisceau d'émission à 90° du faisceau d'excitation.

2.1. FLUORIMÈTRES

On peut trouver des appareils monofaisceau, où on mesure le flux émis par la substance pour une certaine longueur d'onde et des appareils double faisceau comparant le flux émis à celui d'un faisceau de référence. La figure 26 représente un fluorimètre double faisceau.

Un récepteur (photomultiplicateur) reçoit alternativement une partie du faisceau de référence que l'on a réglé auparavant (réglage du blanc) et une partie du faisceau d'émission de fluorescence. La différence énergétique, entre ces deux faisceaux, produit un signal qui commande le servomoteur réglant le diaphragme du faisceau d'excitation ; un disque de mesure est solidaire de ce diaphragme et donne directement l'intensité du faisceau d'émission de fluorescence. Un filtre primaire F_1 et un filtre secondaire F_2 permettant de sélectionner la longueur d'onde recherchée pour la mesure.

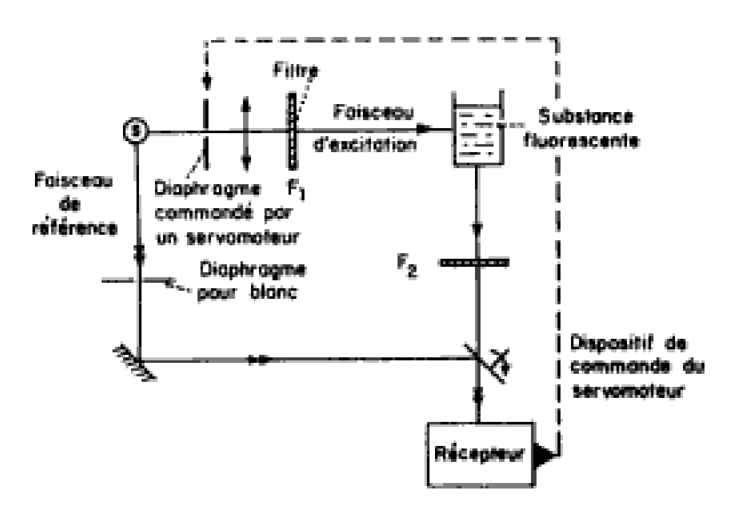


Fig. 26 Schéma d'un fluorimètre.

2.2. SPECTROFLUORIMÈTRES

Ils possèdent deux monochromateurs (en général à réseau); un pour le faisceau d'excitation et un autre pour le faisceau d'émission de fluorescence. On mesure le flux correspondant au faisceau d'émission à l'aide d'un photomultiplicateur. Un dispositif permet de soustraire le blanc; un autre permet de vérifier que le faisceau d'excitation a constamment la même puissance (fig. 27).

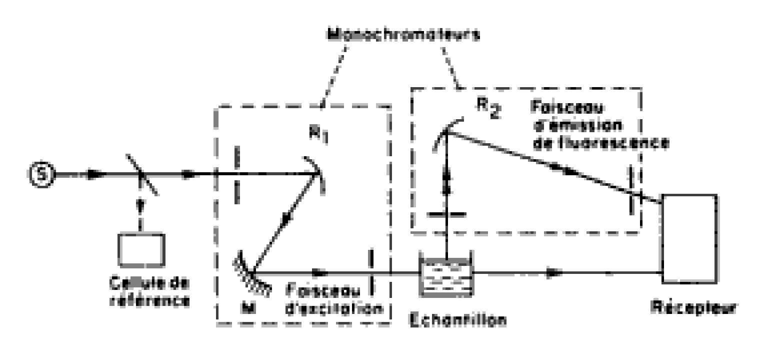


Fig. 27 Spectrofluorimètre.

2.3. SPECTRES DE FLUORESCENCE

On recherche d'abord le spectre d'excitation de l'échantillon, c'est-à-dire le spectre d'absorption. Un dispositif permet donc d'enregistrer la densité optique de la substance en fonction de la longueur d'onde, par mesure du flux énergétique transmis directement (et non à 90° pour la mesure de fluorescence).

On règle alors le monochromateur d'excitation, à la longueur d'onde correspondant à un maximum d'absorption, et on enregistre le spectre d'émission de fluorescence.

Exemple : Spectre de l'anthracène (fig. 28).

Le spectre d'émission de fluorescence a été tracé avec une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 250$ nm.

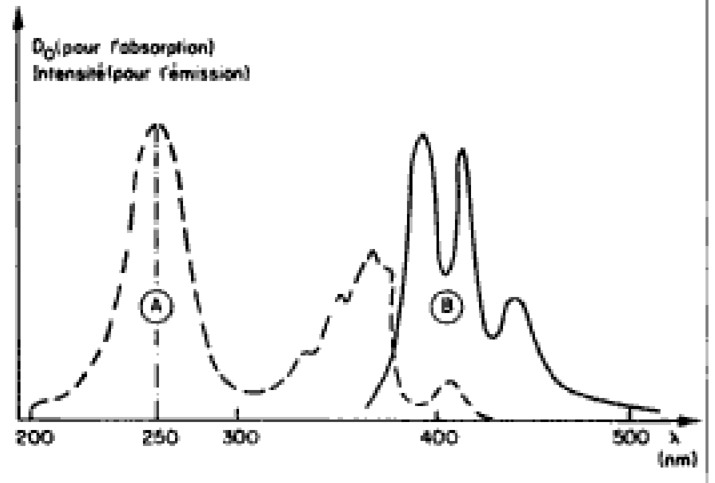


Fig. 28 Spectre de fluorescence de l'anthracène. A) Spectre d'exitation. B) Spectre d'émission de fluorescence.

2.4. RELATIONS QUANTITATIVES

L'intensité du rayonnement de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'une solution en substance fluorescente (aux faibles concentrations) (fig. 29). On peut retrouver cette loi expérimentale à partir de la loi de Beer-Lambert. L'intensité du rayonnement fluorescent est proportionnelle à l'intensité de la lumière absorbée ; le rapport étant appelé *rendement quantique :*

$$I_F = kI_a.$$

Si on utilise la loi de Lambert, l'intensité transmise est I :

$$I = I_0 . 10^{-\varepsilon lc};$$

on obtient alors :

$$I_F = kI_0(1 - 10^{-\varepsilon lc}).$$

Pour les faibles concentrations, un développement limité au premier ordre donne :

$$I_F = 2{,}3\, kI_0\varepsilon lc = Kc \quad \text{(fig. 29}a\text{)}.$$

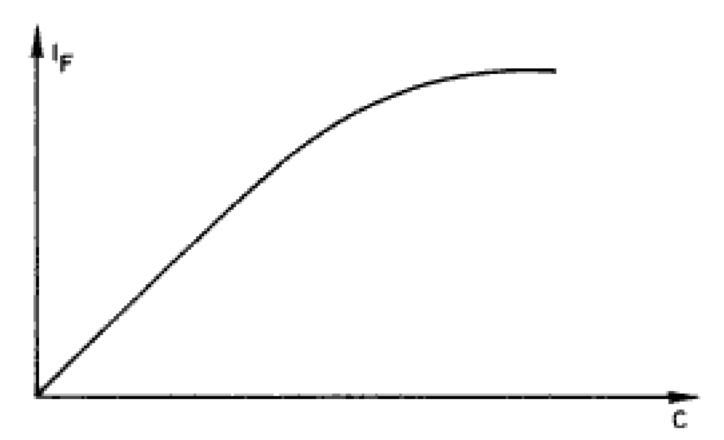


Fig. 29 *a* Variation de l'intensité de fluorescence avec la concentration.

APPLICATIONS DE LA FLUORIMÉTRIE MOLÉCULAIRE

La fluorimétrie est utilisée pour doser directement des substances fort diverses comportant un noyau aromatique ou un hétérocycle. Cette technique est beaucoup plus sensible que l'absorptiométrie moléculaire ; elle permet donc d'abaisser la sensibilité d'un dosage. Mais, en revanche, les contaminants fluorescents du milieu risquent de perturber fortement le dosage.

On utilise également la fluorescence pour doser des substances de façon indirecte. On peut prendre l'exemple du dosage des ions cyanures, dans les eaux. En milieu basique, les ions CN^- catalysent l'oxydation du pyridoxal en pyridoxalactone ; le composé obtenu est très fluorescent.

La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en ions CN^-. On se place à une longueur d'onde d'excitation $\lambda_e = 365$ nm ; la longueur d'onde de fluorescence est alors $\lambda_F = 432$ nm.

On développe la fluorescence avec excitation par laser, qui permet de doser des volumes très petits de solutions. L'utilisation des lasers à colorants permet de choisir facilement la longueur d'onde d'excitation *.

La fluorescence moléculaire est employée, en outre, dans les détecteurs à scintillations liquides, pour les rayonnements radioactifs $\beta^{\ominus}$ (cf. chap. III).

Les avantages de la spectrofluorimétrie moléculaire sont donc :

– la *sensibilité* supérieure à celle de l'absorption moléculaire ;

– la *spécificité* du fait du choix des différents paramètres, lors de l'analyse, notamment des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence. Elle permet donc, sans besoin de séparation, d'éviter les effets d'interférences d'autres composés ;

– la *linéarité :* la relation entre énergie de fluorescence et concentration est linéaire dans des domaines de concentration très étendus. Ceci rend possible des mesures sur des échantillons dont les concentrations peuvent être très différentes, sans avoir recours à de multiples dilutions (fig. 29*a*).

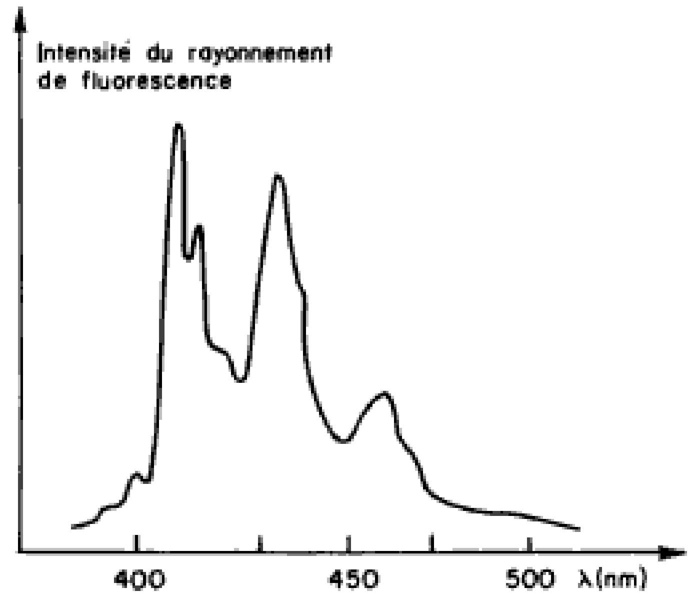


Fig. 29 *b* Spectre de fluorescence du benzopyrène.

* La faible largeur spectrale de l'excitation laser permet d'exciter sélectivement un mélange. La figure 29*b* représente le spectre de fluorescence du benzopyrène dans le cyclohexane excité à 384,0 nm par un laser à colorant.

3. Fluorescence X

L'étude des rayons X a permis aux chimistes de connaître la structure électronique interne des atomes (celles des couches profondes), au voisinage immédiat des noyaux.

Dans les couches profondes des atomes « lourds », comportant beaucoup d'électrons, deux points essentiels sont à considérer :

– les couches électroniques sont toutes saturées ; il n'existe pas de lacunes, à l'état fondamental ;

– les électrons sont très liés au noyau ; les modifications de structure exigent donc des énergies très grandes.

Nous allons envisager successivement les phénomènes d'émission, d'absorption, et, enfin, de fluorescence X.

3.1. ÉMISSION X

Le phénomène d'émission X est décrit dans le paragraphe I.5 (diffraction des rayons X par les cristaux). Nous en rappelons ici le principe. Des atomes lourds, bombardés par des électrons suffisamment énergétiques, subissent les modifications suivantes (fig. 30) :

– des électrons des couches profondes, K ou L par exemple, sont extraits de l'atome qui, par conséquent, s'ionise. Le départ des électrons provoque la formation de lacunes ou vacances sur les couches K ou L ;

– des électrons des couches immédiatement supérieures viennent occuper les lacunes laissées

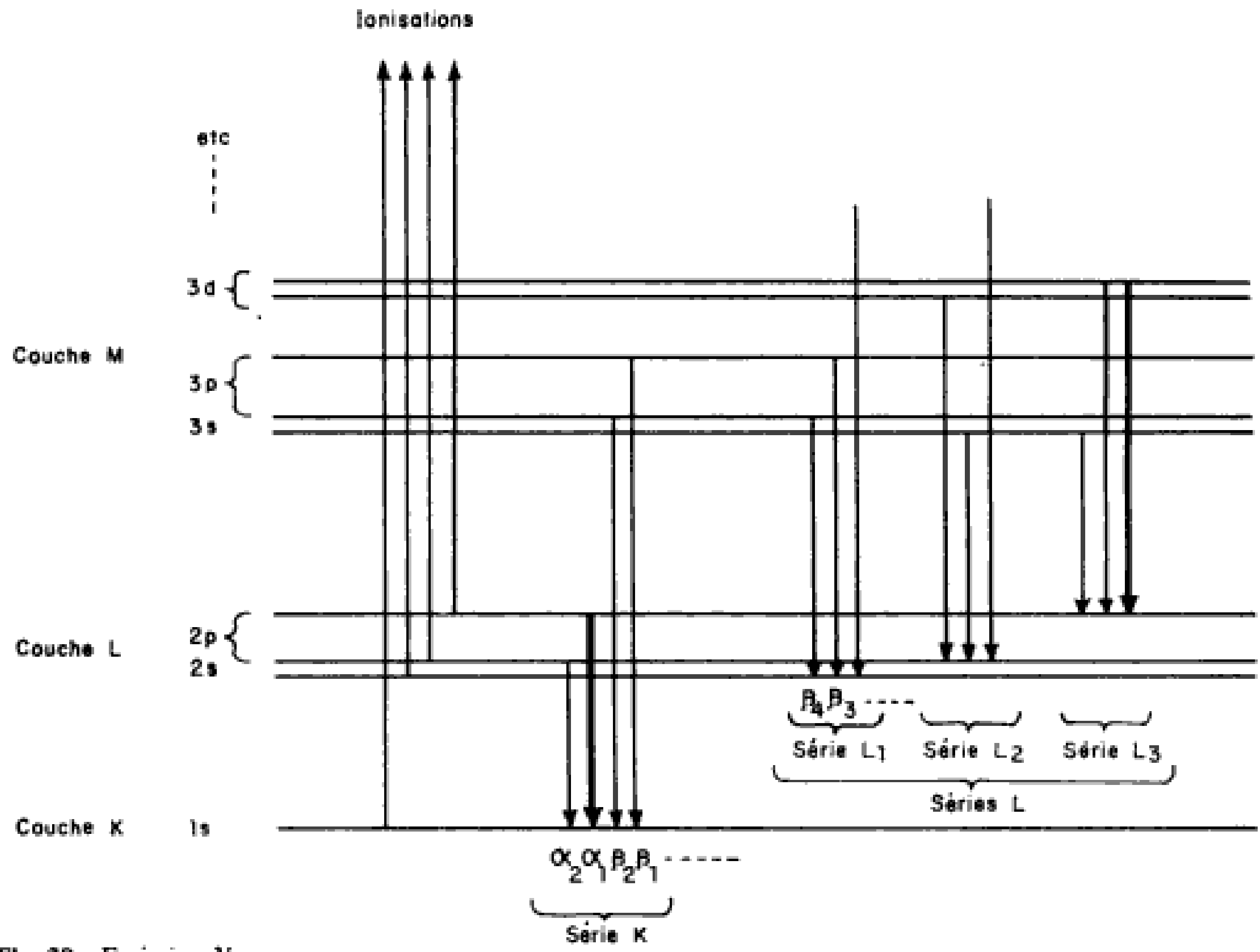


Fig. 30 Emission X.

sur les couches inférieures. L'abaissement correspondant de leur énergie se traduit par une émission de rayons X, constituant un *spectre de raies*, relatives à chacune des transitions réalisées ;

– le freinage d'autres électrons (ceux qui produisent les lacunes sur les couches profondes) est responsable de l'émission d'un *fond continu*, qui se superpose à l'émission des raies envisagée plus haut.

Le spectre d'émission a alors l'allure de la figure 31. Si l'on compare le spectre d'émission X d'un élément à celui qui le suit dans la classification périodique, les couches profondes de ces deux éléments étant très peu différentes, les deux spectres auront des structures très voisines, à un glissement près des longueurs d'onde de l'ensemble du spectre. Les spectres d'émission X ne présentent donc pas la même diversité que les spectres optiques.

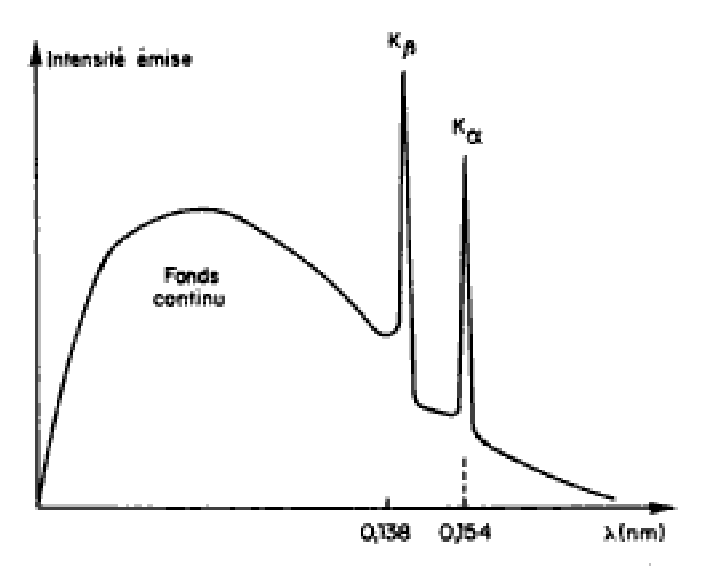


Fig. 31 Spectre d'émission du cuivre (tension accélératrice ~ 45 kV).

3.2. ABSORPTION X

On obtient le spectre d'absorption X d'un corps, en étudiant l'énergie transmise, dans un faisceau de rayons X, en fonction de la longueur d'onde, par le corps considéré.

Les points essentiels sont les suivants :

– le spectre d'absorption X est indépendant de la forme dans laquelle les atomes sont combinés dans les molécules. C'est une propriété caractéristique des atomes considérés ;

– le spectre d'absorption X est continu ; il ne présente pas de raies d'absorption, mais l'intensité absorbée subit des discontinuités (fig. 32).

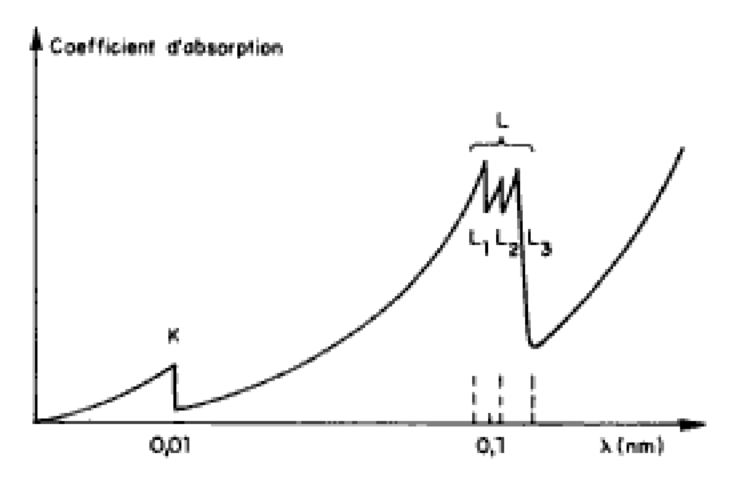


Fig. 32 Spectre d'absorption du plomb.

L'interprétation est donnée par le diagramme énergétique. Les photons X sont absorbés lorsqu'ils produisent une extraction de l'électron d'une couche interne K, L, etc. Chaque discontinuité apparaît lorsque l'énergie des photons est suffisante pour faire passer un électron d'une couche, K par exemple, dans la zone où il est libre, c'est-à-dire où son énergie de liaison est nulle (fig. 33).

3.3. FLUORESCENCE X

Lorsque la matière est frappée par des rayons X ou des rayons γ, elle émet un rayonnement, dans toutes les directions, de longueur d'onde différente du rayonnement incident. Le rayonnement émis, appelé rayonnement de fluorescence, est caractéristique de la substance irradiée.

L'explication du phénomène est simple, lorsqu'on considère un diagramme énergétique : le rayonnement incident produit, par effet photoélectrique, une ionisation de l'atome, créant ainsi une lacune électronique ; lorsque des élec-

Couche M
Couche L
Couche K 1s
Couches internes
λ_{L_1} λ_{L_2} λ_K
Transitions possibles, en émission
Transitions impossibles, en absorption
Extractions possibles en absorption (effet photoélectrique)

Fig. 33 Interprétation de l'absorption X.

trons viennent occuper ces lacunes, ils perdent de l'énergie, en émettant le rayonnement dit de fluorescence.

Le rendement de fluorescence, correspondant à l'énergie émise, par rapport à l'énergie absorbée, n'est pas égal à 100 p. 100. La principale explication vient de l'auto-absorption par la substance, du rayonnement fluorescent (« quenching »), possible, ici, à cause de la transition que vient de subir un électron d'énergie supérieure.

3.3.1. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

La figure 34 représente le schéma d'un appareil à fluorescence X classique. Une source de rayons X (tube avec anticathode en rhodium par exemple) émet des photons X qui sont dirigés, par un dispositif collimateur, vers l'échantillon à analyser ; celui-ci peut se présenter sous forme de pastilles ou en solution. Le rayonnement X fluorescent est alors dirigé, par un collimateur, vers le monochromateur qui doit en mesurer l'intensité, grâce à un détecteur de flux.

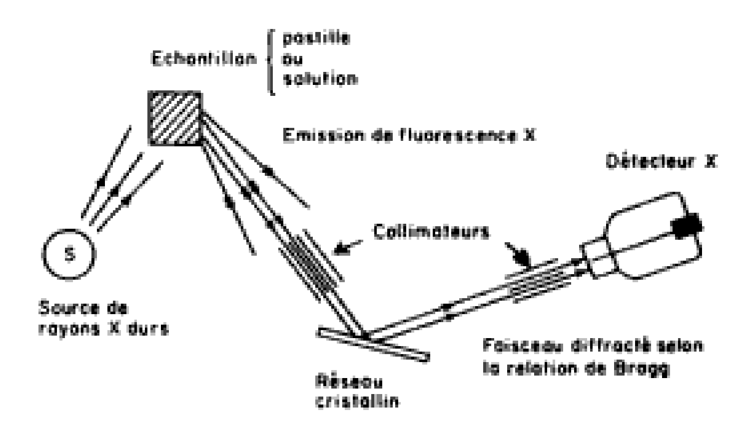


Fig. 34 Dispositif de fluorescence X.

Les sources de rayons X utilisées comportent une anticathode en tungstène, molybdène,

rhodium, etc. Elle doit émettre un rayonnement polychromatique très dur, pouvant extraire des électrons des couches K ou L de la cible (échantillon à analyser).

3.3.2. FILTRES MONOCHROMATEURS X

La mesure de l'intensité du rayonnement fluorescent X renseigne, en analyse, sur la nature de la substance irradiée par le faisceau primaire X ou γ.

Ce rayonnement est en général complexe ; il est nécessaire de séparer, dans le spectre émis, une raie caractéristique (à la fois fine et intense). On dispose, comme en optique ordinaire, de filtres et de monochromateurs.

3.3.2.1. Filtres X

Si on étudie une seule substance fluorescente X, on peut isoler facilement une des raies, K_α, par exemple, en utilisant une autre substance dont la discontinuité d'absorption est intermédiaire entre les raies K_α et K_β. La figure 35 montre le principe d'une telle filtration.

Le rayonnement à filtrer traverse une feuille mince (quelques millimètres) de zirconium, lorsque la substance fluorescente est du molybdène. Après la traversée de la feuille de zirconium, la raie K_β a été pratiquement absorbée ; la raie K_α est donc isolée.

3.3.2.2. Monochromateurs

Lorsqu'on désire une séparation plus rigoureuse, on peut employer le dispositif schématisé fig. 36. Un cristal est utilisé comme réseau de diffraction (cf. I.5, 2). Il diffracte les rayons X dans des directions bien précises, données par la loi de Bragg. Une fente, placée dans un écran de plomb, par exemple, laisse passer seulement les radiations obéissant à la loi de Bragg. Si la séparation n'est pas suffisante, on lui adjoint un deuxième monochromateur.

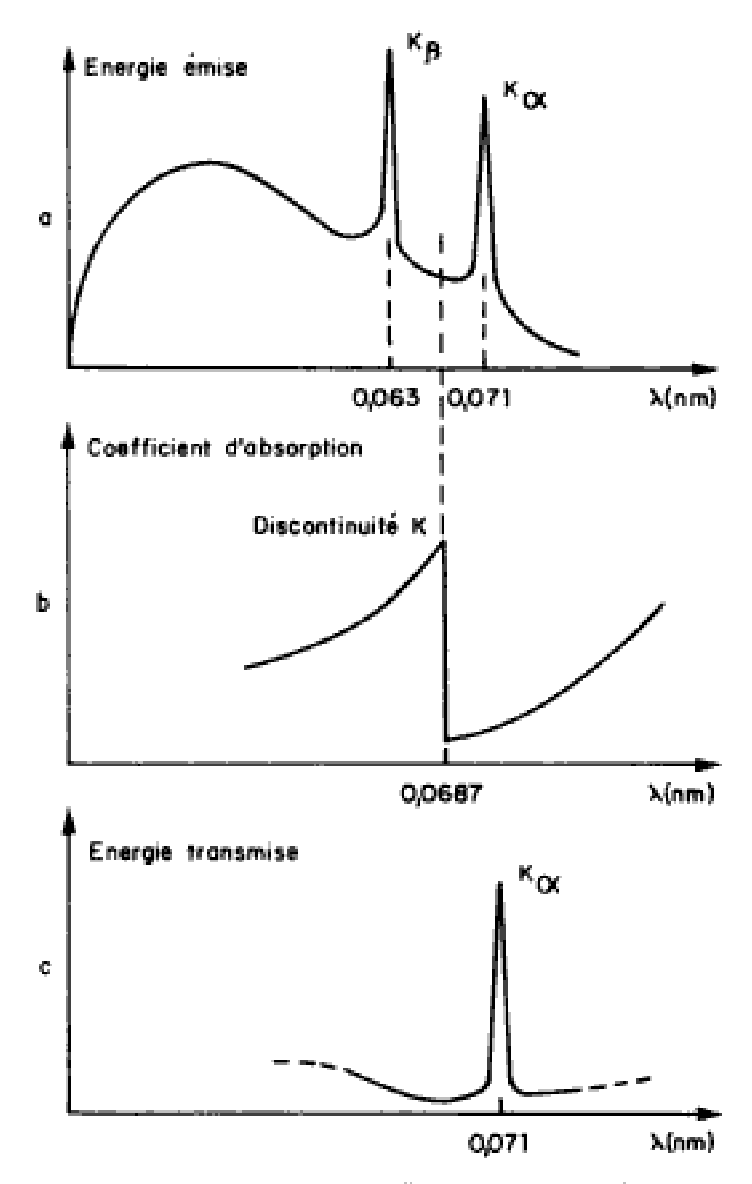


Fig. 35 Principe d'une filtration X. *a)* Spectre d'émission du molybdène. *b)* Spectre d'absorption du zirconium (au voisinage de 0,05 nm). *c)* Énergie transmise par le filtre.

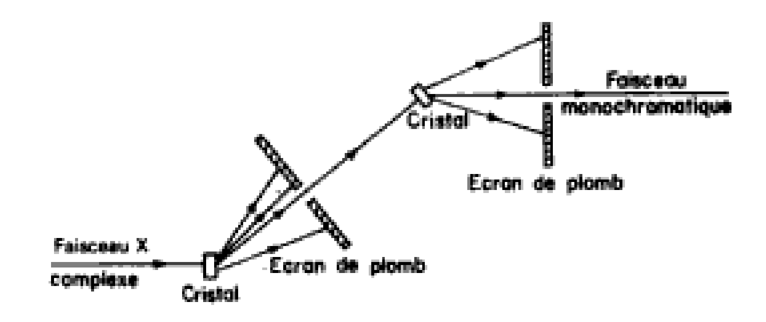


Fig. 36 Principe d'un monochromateur double.

3.3.3. DÉTECTEURS DE RAYONS X

Dans le domaine des rayons X, deux techniques de détection sont en présence : les compteurs à ionisation et les scintillateurs.

1) Les *compteurs à ionisation* sont décrits dans le chapitre III. Ce type de compteur est utilisé pour des rayons X mous (0,08 à 0,2 nm). Ils doivent comporter une fenêtre suffisamment mince pour être transparents aux rayons X et assez épaisse pour contenir le gaz du compteur placé dans le vide.

Des fenêtres de béryllium de quelques 1/100e de mm d'épaisseur sont le plus couramment employées. Le gaz de remplissage peut être de l'argon ou du xénon, pour les énergies les plus grandes. S'ils sont utilisés dans le domaine proportionnel, ils renseignent sur l'énergie des rayons X incidents.

2) Les *compteurs à scintillation* permettent l'étude d'une plus large plage du spectre X. Le photon X incident donne, par effet photoélectronique, des électrons secondaires absorbés par le scintillateur lui-même qui émet alors des photons ultraviolets ou visibles qui sont reçus par une photocathode d'un photomultiplicateur d'électrons (P.M.). Ainsi l'impulsion électrique de sortie est, en général, proportionnelle à l'énergie du photon X incident. Les scintillateurs les plus courants pour la spectrométrie X sont NaI et CsI.

L'intensité d'une radiation X correspond à un certain nombre de photons émis par unité de temps. Les compteurs transforment ces photons en impulsions électriques. Le résultat, exprimé en coups par unité de temps, chiffre ainsi l'intensité de la radiation étudiée.

Applications de la fluorescence X

Les premiers éléments de la classification périodique ne peuvent être étudiés en fluorescence X ; cela élimine donc l'analyse de la plupart des composés organiques ne comportant pas d'éléments métalliques « lourds ».

Les principales applications se trouvent dans la métallurgie, la chimie des ciments, des huiles végétales, etc.

I.3. Photométrie d'absorption atomique

Nous avons étudié, dans le tome 1, l'émission de rayonnement par les atomes excités (le sodium, chauffé, émet une radiation jaune). On peut montrer qu'inversement, les atomes sont capables d'absorber les radiations identiques à celles qu'ils peuvent émettre, dans les mêmes conditions.

1. Origine de l'absorption atomique

En considérant le diagramme d'énergie atomique de sodium (fig. 37) on voit que l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ peut produire la transition : $3s \rightarrow 3p$, alors que la transition inverse produit l'émission d'un photon de même énergie.

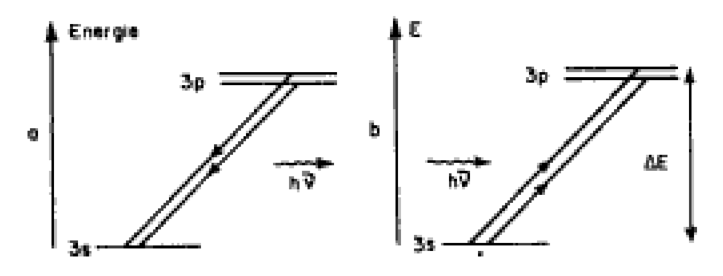


Fig. 37 *a)* Émission. *b)* Absorption.

Pour observer une transition provoquée par absorption d'un photon, il est nécessaire que des atomes se trouvent dans l'état d'énergie fondamental, non excité ($3s$ dans le cas du sodium). Si ces atomes se trouvent à une température élevée, l'énergie thermique, proportionnelle à la température absolue T, peut les exciter et leur donner l'énergie d'un niveau plus élevé ($3p$ dans le cas du sodium); dans cet état, ils ne peuvent plus absorber le rayonnement et la transition étudiée n'est plus possible.

Pour apprécier l'importance de ce phénomène, on peut utiliser la relation statistique de Boltzmann. Le nombre d'atomes N, à température élevée T (dans une flamme, par exemple), se répartit en :

- N_0 atomes dans l'état fondamental,
- N_1 atomes dans l'état excité 1.

Si ΔE représente la différence d'énergie entre les deux états, la relation de Boltzmann est :

$$N_1 = N_0 e^{-\Delta E/kT}$$

où k est la constante de Boltzmann.

A une température T = 3 000 K, on obtient les valeurs suivantes pour le rapport N_1/N_0 :

- sodium (λ = 589 nm) : $5{,}9 . 10^{-4}$;
- calcium (λ = 423 nm) : $3{,}7 . 10^{-5}$;
- zinc (λ = 214 nm) : $5{,}6 . 10^{-10}$.

On remarque donc que, même pour une température élevée, le rapport du nombre d'atomes excités au nombre d'atomes dans l'état fondamental, est très faible. Si le nombre d'atomes excités est faible, le phénomène d'absorption atomique peut donc avoir lieu. On comprend ainsi que la photométrie d'absorption présente une sensibilité plus grande que la photométrie d'émission ; de plus, l'émission n'est pas un phénomène gênant pour l'absorption puisque les atomes excités par la chaleur vont émettre un rayonnement de même longueur d'onde que celui qu'ils absorbent, mais dans toutes les directions. De plus, les appareils comportent un dispositif éliminant cette émission.

2. Étude expérimentale

Le principe général de la méthode est le suivant : un faisceau de lumière sensiblement monochromatique traverse une flamme dans laquelle on introduit l'élément à doser sous la forme d'un brouillard de fines gouttelettes. Le faisceau incident est absorbé proportionnellement à la longueur traversée par le rayonnement et au nombre d'atomes neutres de cet élément par unité de volume de la solution.

On retrouve les caractéristiques principales d'un spectrophotomètre d'absorption. Un spectrophotomètre d'absorption atomique peut donc se réduire schématiquement aux éléments suivants :

– une source lumineuse émettant la raie correspondant à l'élément à doser ;

– un système générateur d'atomes : flamme ou four à graphite ;

– un monochromateur de bonne résolution ;

– un détecteur de flux associé à un dispositif de mesure.

2.1. DIFFÉRENTS MONTAGES

On distingue les appareils à simple faisceau et ceux qui utilisent un montage différentiel à double faisceau.

2.1.1. MONTAGE SIMPLE FAISCEAU (fig. 38)

L'amplificateur délivre un courant proportionnel au flux reçu. On compare donc le flux reçu lorsqu'on vaporise le blanc à celui obtenu lorsqu'on vaporise la solution à doser. La différence permet d'obtenir la densité optique de la solution.

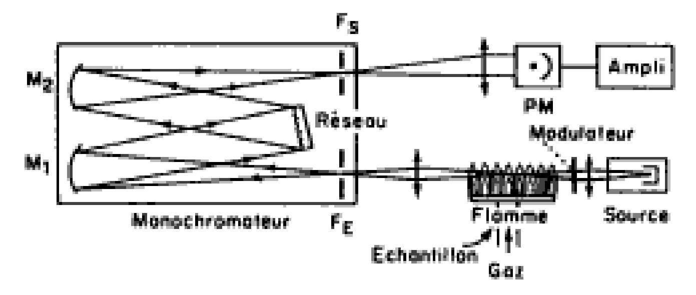


Fig. 38 Montage simple faisceau.

Pour éliminer le signal électrique qui serait dû aux radiations *émises* par la substance, on module le faisceau incident avec une fréquence caractéristique et on accorde l'amplificateur, situé après le photomultiplicateur, à la même fréquence ; seul est donc amplifié le signal dû au faisceau qui a subi l'absorption.

Un tel montage a l'avantage d'être simple et sensible car il ne partage pas l'énergie émise par la source en plusieurs faisceaux et ne nécessite pas une amplification trop élevée. Le rapport signal/bruit de fond est donc meilleur (le signal est toujours entaché d'un bruit de fond dû aux variations de la flamme, de la source et au système de détection lui-même). L'inconvénient de ce montage est dû aux fluctuations de la source lumineuse dont l'instabilité peut nuire, surtout dans une longue série de mesures.

2.1.2. MONTAGE DOUBLE FAISCEAU (fig. 39)

Dans ce cas, la lumière monochromatique est divisée en deux faisceaux. L'un est envoyé directement au monochromateur ; il constitue le

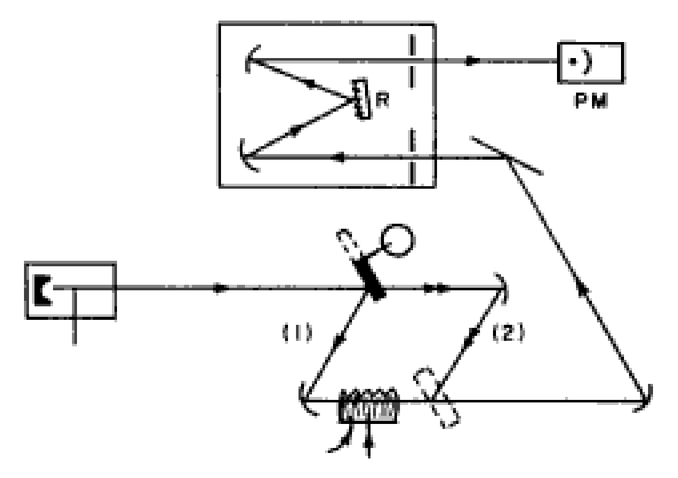


Fig. 39 Spectromètre à double faisceau.

faisceau de référence (2). L'autre passe à travers la flamme et constitue le faisceau de mesure (1).

Par un procédé optique ou électrique, on règle, avant la mesure, l'appareil pour obtenir l'égalité entre les courants produits par les deux faisceaux. La figure 39 représente le schéma d'un appareil de ce type.

L'absorption atomique, produisant un affaiblissement du faisceau de mesure, l'égalité entre les courants produits par les deux faisceaux n'est plus réalisée. C'est cette différence qui peut être appréciée et qui mesure l'absorption par la flamme. Un tel montage compense donc les variations dues à la source et au récepteur.

Beaucoup d'appareils utilisent un faux double faisceau. Leur principe consiste à comparer le flux transmis par une substance, à celui d'une source auxiliaire dont l'intensité est constante.

Il existe également des spectrophotomètres à double faisceau et à canaux. La figure 40 en donne un schéma. Ils permettent de doser simultanément deux éléments différents du même échantillon. Dans ce spectromètre, le

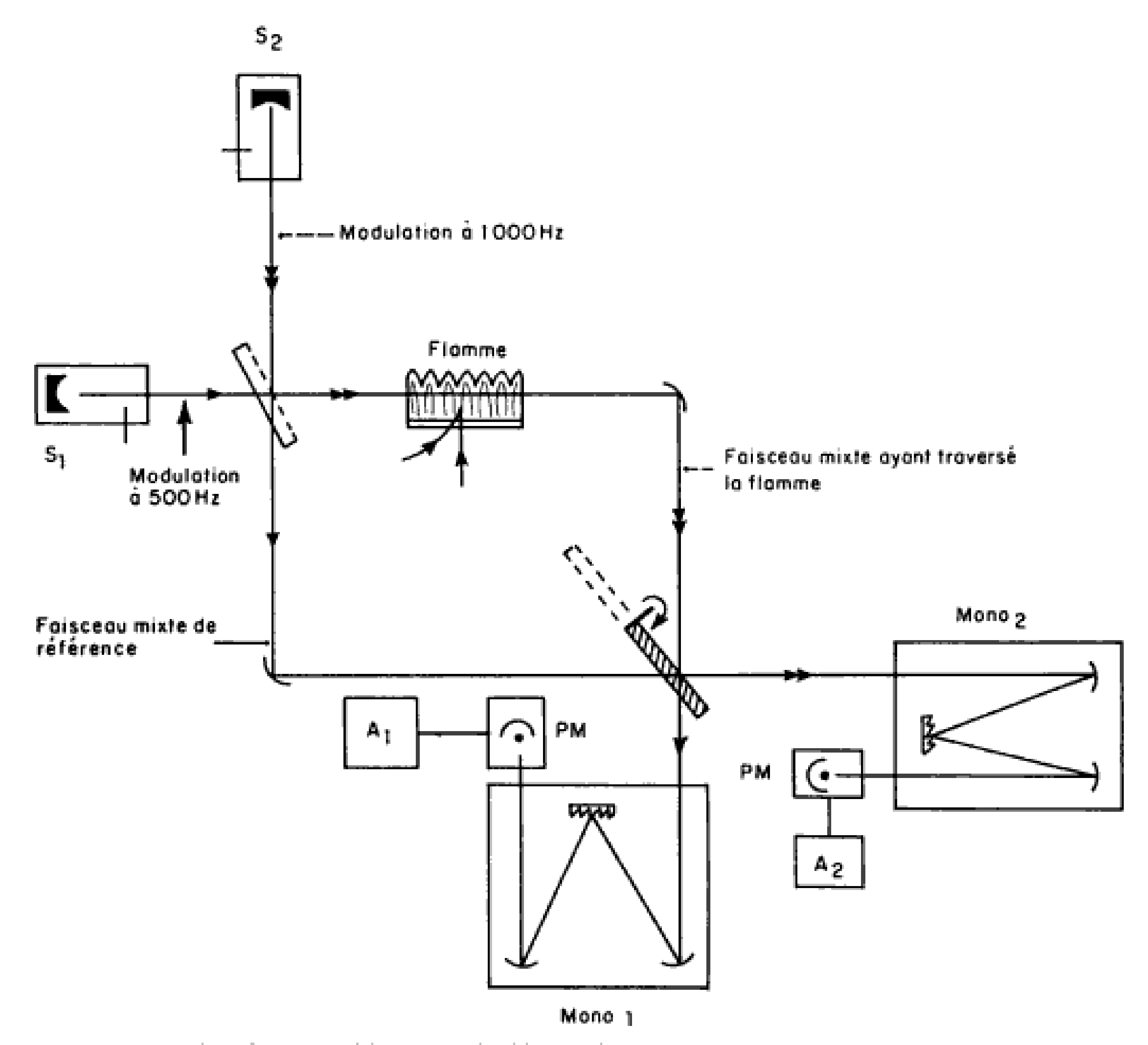


Fig. 40 Spectromètre à double faisceau et double canal.

faisceau issu de la source S_1 est modulé à 500 Hz, par exemple, tandis que le faisceau issu de la source S_2 est modulé à 1 000 Hz. Ces deux faisceaux sont envoyés ensemble soit dans la flamme F, soit dans le faisceau de référence, au moyen d'une lame semi-argentée M_1. Les deux faisceaux comportent donc les radiations issues des deux sources : on les appelle des faisceaux *mixtes*.

Les deux faisceaux mixtes sont discriminés :

– par les monochromateurs (1) et (2), qui isolent la radiation recherchée, correspondant à l'élément à doser ;

– par les amplificateurs A_1 et A_2 accordés respectivement sur les fréquences de 500 et 1 000 Hz.

Chacun des récepteurs permet ainsi de mesurer l'absorption de la flamme correspondant aux deux sources S_1 et S_2.

2.2. SOURCE LUMINEUSE

Bien qu'il paraisse possible d'employer une source à spectre continu, à laquelle on ajoute un monochromateur sélectif, on préfère utiliser des lampes à spectre de *raies* où l'élément émissif est le métal lui-même à doser.

On peut montrer en effet que le rapport énergie absorbée/énergie incidente est beaucoup plus favorable dans ce cas, à cause de la largeur de la bande passante du monochromateur qu'il faut utiliser avec une source continue.

Pour les alcalins, le mercure, le thallium, etc., on peut utiliser des lampes à vapeur métallique classiques telles que celles qu'on emploie en polarimétrie. On peut également mettre en œuvre des lampes valables pour beaucoup d'autres métaux : les lampes à cathode creuse. Le principe des lampes à cathode creuse dérive de celui des tubes de Geissler. Un tube (fig. 41) contient un gaz de remplissage (gaz rare : argon ou néon), une anode, généralement constituée d'un fil de tungstène et une cathode creuse contenant l'élément dont on veut utiliser le spectre d'émission.

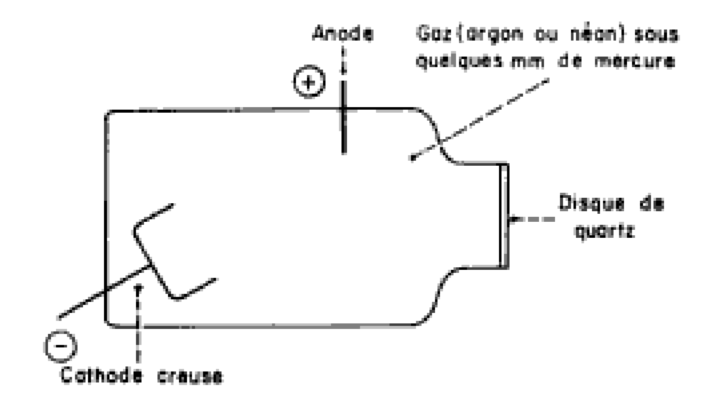


Fig. 41 Lampe à cathode creuse.

La différence de potentiel entre anode et cathode étant de quelques centaines de volts, un phénomène d'ionisation se produit à l'intérieur. Les ions, accélérés par le champ électrique, viennent frapper la cathode. Ils ont alors acquis une énergie cinétique suffisante pour arracher des atomes métalliques à la cathode et les exciter. Ces atomes excités émettent alors un spectre caractéristique de la cathode et du gaz de remplissage (fig. 42).

Pour les métaux usuels, durs mais facilement usinables (Cu, Fe...), on peut utiliser un petit cylindre taillé dans la masse. Sinon on emploie une matrice en aluminium (spectre d'émission non gênant) à l'intérieur de laquelle on plaque une feuille du métal à étudier.

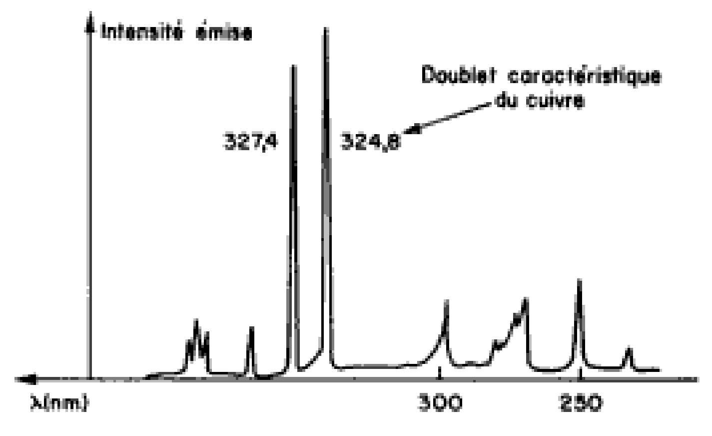


Fig. 42 Spectre d'émission d'une lampe à cathode creuse (Cu/Argon).

Les qualités essentielles d'une lampe à cathode creuse sont :

– stabilité d'émission (surtout pour les montages à simple faisceau) ;

– production de raies étroites et de grande intensité ;

– possibilité d'alimenter les lampes en courant pulsé, ce qui provoque une modulation du faisceau lumineux émis.

2.3. GÉNÉRATEUR D'ATOMES

Il est nécessaire que les gaz ou les vapeurs qui vont absorber le faisceau lumineux soient à l'état atomique. La plupart des gaz et des vapeurs sont, à température ordinaire, à l'état moléculaire. Or les vapeurs moléculaires ont, comme les liquides, des spectres d'absorption formés de bandes qui masquent l'absorption des raies.

Un autre phénomène intervient : c'est l'ionisation des atomes. Si les vapeurs sont portées à une température très élevée, on peut obtenir le spectre d'absorption des atomes ionisés. C'est pourquoi on préfère, en absorption atomique, des flammes ou d'autres dispositifs d'atomisation, pas trop chauds.

2.3.1. LA FLAMME

Le moyen le plus simple consiste à nébuliser l'échantillon dans une flamme. Ce système est identique à celui déjà décrit dans le paragraphe sur l'émission (tome 1, III.1). Le brûleur représente l'élément essentiel des photomètres d'absorption ; la qualité des mesures dépend de la géométrie et de la stabilité de la flamme. Contrairement à l'émission, où on recherche une flamme étroite, dans l'absorption, on tend à élargir le panache où va se produire l'absorption (fig. 43).

Comme nous l'avons précisé, le rapport du nombre d'atomes excités au nombre d'atomes dans l'état fondamental ne dépend que de la température. Si celle-ci est constante, il s'établit un régime stationnaire et l'absorption est constante.

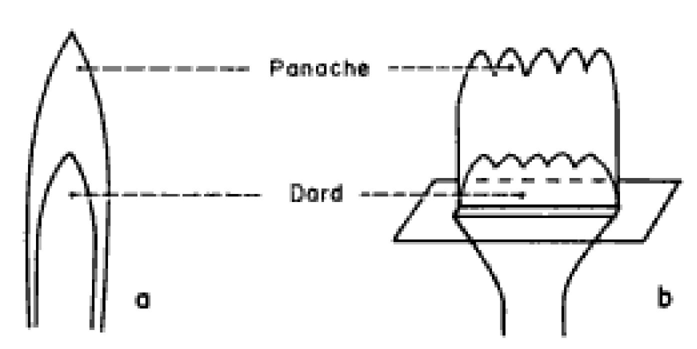


Fig. 43 Forme des flammes. *a*) Émission. *b*) Absorption.

2.3.2. LE FOUR A GRAPHITE

Dans ce dispositif, l'atomisation est réalisée par réduction des oxydes de fer par le carbone, à haute température. On introduit quelques µl de solution dans le four qui est chauffé alors selon un cycle parfaitement programmé :

– évaporation de la phase liquide jusqu'à une température de 100 °C. Ce chauffage du four, à une température relativement faible, doit être opéré très lentement :

– oxydation des sels et transformation en oxydes, à une température dépendant de la nature des métaux présents ;

– atomisation de l'échantillon par réduction des oxydes à une température comprise entre 1 000 °C et 2 000 °C. Il faut veiller à ne pas dépasser une température au-delà de laquelle *l'ionisation* des atomes diminuerait le nombre de ceux qui peuvent absorber la lumière ;

– purgeage du système à une température supérieure à 2 000 °C.

Dans ce cas, l'échantillon introduit au début du cycle, fournira un signal qui aura l'allure d'un pic dépendant de la vitesse des opérations. On pourra soit utiliser la hauteur, soit déterminer la surface du pic, pour obtenir une sensibilité supérieure.

2.4. RÉCEPTEUR

Le récepteur photoélectronique doit rester sensible dans un large domaine spectral (190 à 850 nm). Les photomultiplicateurs d'électrons

sont les plus utilisés, car ils se prêtent bien à l'amplification alternative, après modulation du faisceau incident.

En effet, le faisceau reçu par le détecteur comprend le flux transmis par la flamme, après absorption, augmenté du flux émis par les atomes, après excitation. Pour éliminer ce dernier, on module le faisceau incident :

– à l'aide d'un disque tournant (fig. 40);

– au moyen d'une modulation électrique de la source de lumière.

L'amplificateur, accordé sur la fréquence de modulation, n'amplifie que le signal modulé, c'est-à-dire celui qui a été absorbé par la flamme.

Certains systèmes à microprocesseurs procèdent directement au traitement du signal obtenu avec le photomultiplicateur P.M. Ils calculent et affichent les résultats en densité optique ou en unités de concentrations choisies.

Remarque :

Le signal de sortie d'un P.M. relié à un amplificateur est en général analogique : intensité d'un courant ou tension proportionnelles au flux reçu par le P.M. (fig. 44). Ce signal de sortie varie dans le temps ; après un temps de montée variable, il se stabilise suivant un plateau, dont la stabilité n'est pas rigoureuse (parasites dus au secteur, irrégularités de la flamme, de la nébulisation et de l'atomisation). On repère ce signal soit par intégration pendant un temps réglable, soit par différentes mesures de hauteur au niveau du palier. On peut convertir ce signal en impulsion dont le nombre est proportionnel à la hauteur du signal.

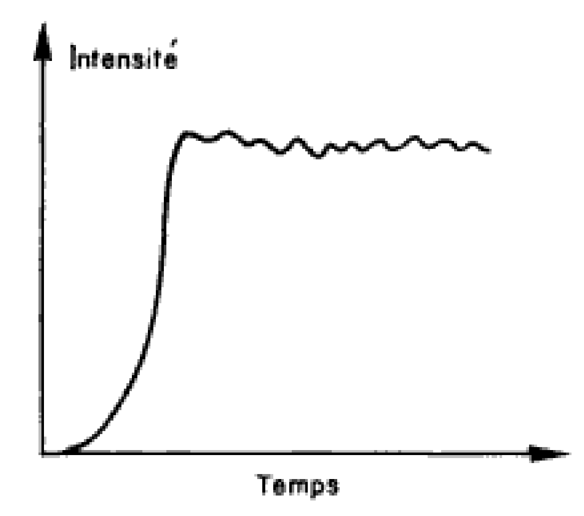


Fig. 44 Allure du signal de sortie d'un P.M.

3. Applications analytiques

3.1. INTÉRÊT DE LA MÉTHODE

La spectrométrie d'absorption atomique se caractérise par des qualités particulières de sensibilité et de spécificité. La loi de Beer-Lambert utilisée dans la photométrie d'absorption moléculaire reste valable en absorption atomique. On définit ainsi un coefficient d'absorption atomique k (cf. tome 1) :

$$\log \frac{\Phi_0}{\Phi} = k.l.c.$$

Le coefficient d'absorption atomique dépend de la température de la flamme, de la pression, de la source d'émission (l'énergie absorbée est relativement plus importante lorsque la raie émise est plus étroite). L'absorption de rayonnement est donc proportionnelle à la concentration de l'élément à doser, à condition qu'elle ne soit pas trop élevée.

La méthode s'applique, en principe, à tous les éléments présentant une raie de résonance de longueur d'onde supérieure à 190 nm; cette condition exclut les non-métaux tels que halogènes, soufre, carbone, phosphore...

Les limites de détection s'expriment en $\mu g/cm^3$. Elles dépendent de la nature du milieu d'analyse, de l'appareillage et de l'élément à doser. On peut distinguer deux ensembles de métaux :

– alcalins, alcalinoterreux, cuivre, zinc, etc.,

qui peuvent être dosés à des teneurs de 0,1 µg/cm³ ;

– autres métaux de transition : chrome, manganèse, fer, cobalt, etc., qui peuvent être dosés à des taux de 100 µg/cm³.

Cette technique ne nécessite que deux qualités pour l'échantillon : fluidité et homogénéité. Des manipulations préliminaires doivent communiquer ces propriétés aux prises d'essai. Les prélèvements liquides, dont la viscosité et la tension superficielle sont voisines de celles de l'eau, peuvent être nébulisés directement.

Le succès de l'absorption atomique est dû aux nombreux avantages qu'elle présente :

– grande sensibilité : quelques µg/cm³ ;
– bonne précision : 0,5 p. 100 en série ;
– bonne adaptation aux analyses en séries.

3.2. PRINCIPE D'UN DOSAGE

TRACÉ D'UNE COURBE D'ÉTALONNAGE AVEC GAMME DE CONCENTRATIONS

On mesure l'absorption de solutions dont on connaît les concentrations, obtenues par dilution d'une solution mère donnée. On trace alors la courbe d'étalonnage représentant les variations de cette absorption en fonction de la concentration. A l'aide de cette courbe, on peut ensuite déterminer la concentration de solutions inconnues.

Remarque :

Il arrive, qu'après évaporation du solvant dans la flamme, certaines gouttelettes de solution se transforment en particules solides, trop grosses pour subir la fusion et l'évaporation immédiates. L'atmosphère de la flamme devient alors trouble et produit la diffusion de la lumière. On peut corriger cet effet par comparaison avec un « blanc » contenant les substances responsables de la diffusion, mais ne comportant pas l'élément à doser.

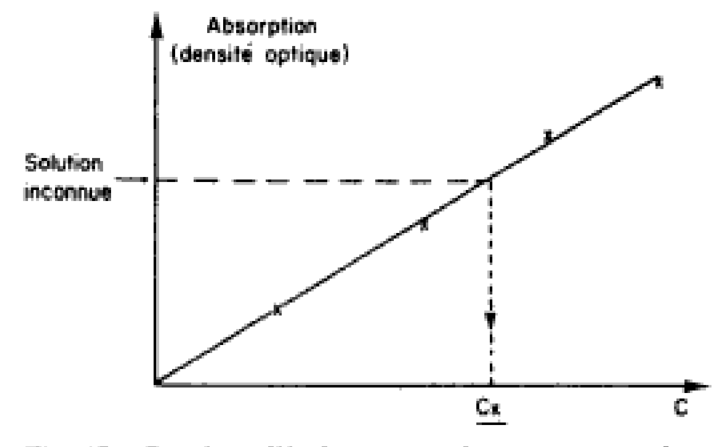


Fig. 45 Courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations connues.

I.4. Résonance magnétique nucléaire

Cette technique, qui a subi un essor considérable, depuis 1960, étudie l'absorption moléculaire dans le domaine des fréquences radio, de l'ordre du mégahertz (MHz), c'est-à-dire à des longueurs d'onde d'une dizaine de mètres. Le type d'énergie qui est utilisé concerne *les noyaux* en présence *d'un champ magnétique extérieur*.

1. Propriétés magnétiques des noyaux

1.1. MODÈLE CLASSIQUE

On peut représenter le noyau d'un atome, d'après un modèle classique simplifié : on le considère comme une petite sphère chargée possédant un mouvement de rotation autour d'un axe. Ce mouvement de particules chargées (les nucléons) produit, dans l'espace autour du noyau, un champ magnétique ; le noyau se comporte donc comme un petit aimant que l'on caractérise par son moment magnétique (de la même façon qu'un dipôle électrique est caractérisé par son moment dipolaire). La figure 46 indique les différentes façons de représenter un noyau.

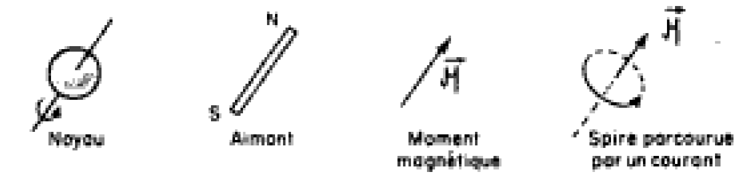


Fig. 46 Le noyau magnétique.

En présence d'un champ magnétique extérieur $\vec{B}$, tous les aimants que constituent les noyaux subissent une action (couple) qui tend à les placer de telle façon que leur moment magnétique $\vec{M}$ soit colinéaire au champ magnétique $\vec{B}$. On peut dire que le petit aimant possède alors de l'énergie magnétique qu'il peut transformer en travail. L'énergie magnétique W vérifie la relation :

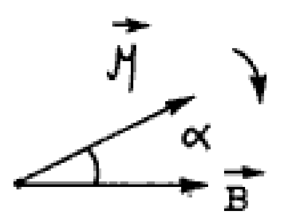


Fig. 47 Moment magnétique.

$$W = -\vec{M}.\vec{B} = -M.B.\cos\alpha.$$

1.2. ASPECT QUANTIQUE

Comme on l'a déjà vu à propos du modèle classique d'une liaison de covalence (ressort), le modèle classique de l'aimant n'est pas suffisant pour expliquer toutes les propriétés des noyaux. Les résultats de la mécanique quantique sont les suivants :

1) Le moment magnétique d'un noyau est quantifié :

$$M = \sqrt{I(I+1)}M_B.$$

I est le nombre quantique de spin ou « spin nucléaire » ; M_B est une constante (magnéton de Bohr).

2) La direction du moment magnétique, dans un champ magnétique, est quantifiée. On peut représenter les valeurs de la composante de $\vec{M}$ suivant la direction de $\vec{B}$:

$$M_z = m.\gamma.\frac{h}{2\pi}$$

m est un nombre quantique compris entre $-$ I et $+$ I ($-\,I < m < +\,I$); γ est une constante appelée rapport gyromagnétique; h est la constante de Planck.

Pour un noyau de spin nucléaire I, il existe (2 I + 1) orientations possibles du moment magnétique dans un champ magnétique.

Comme, seule, l'orientation de $\vec{M}$ est donnée, $\vec{M}$ peut tourner autour de la direction de $\vec{B}$: c'est le mouvement de précession.

Exemple (fig. 48) :

Le proton possède un spin $I = \frac{1}{2}$, M peut prendre les valeurs $-\frac{1}{2}$ et $+\frac{1}{2}$, $\vec{M}$ peut avoir deux directions, telles que :

$$- \quad M_z = -\frac{1}{2}\frac{h}{2\pi}\gamma,$$
$$- \quad M_z = +\frac{1}{2}\frac{h}{2\pi}\gamma.$$

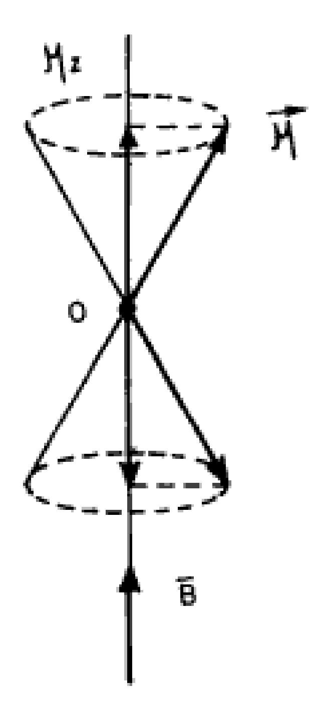


Fig. 48 Mouvement de précession du moment magnétique du proton.

1.3. NOYAUX POSSÉDANT UN SPIN NUCLÉAIRE

Les noyaux intéressants en RMN sont ceux qui ont un spin nucléaire différent de zéro. Pour que le spin soit différent de zéro, il faut que les noyaux ne comportent pas simultanément un nombre pair de neutrons et de protons.

— Les noyaux ayant un nombre de masse A pair et un nombre atomique Z pair ont un spin nucléaire nul :

$${}^{12}_{6}C;\ {}^{16}_{8}O;\ {}^{18}_{8}O;\ {}^{32}_{16}S\}I = 0.$$

— Les noyaux de nombre de masse A impair ont un spin I qui est un multiple impair de $\frac{1}{2}$:

noyaux : ${}^{1}_{1}H$ ${}^{11}_{5}B$ ${}^{13}_{6}C$ ${}^{15}_{7}N$ ${}^{17}_{8}O$ ${}^{19}_{9}F$ ${}^{31}_{15}P$

spin : $\frac{1}{2}$ $\frac{3}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{5}{2}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$

$\Big\}\ I = (2k+1)\cdot\frac{1}{2}.$

— Les noyaux de nombre atomique Z impair (et A pair) ont un spin entier :

noyaux : ${}^{2}_{1}H$ ${}^{14}_{7}N$

spin : 1 1.

Les molécules organiques simples auront donc un moment magnétique nucléaire à cause des atomes d'hydrogène ; on peut utiliser aussi le carbone ${}^{13}_{6}C$ qui permet de nombreuses applications aujourd'hui.

1.4. ÉNERGIE MAGNÉTIQUE

1.4.1. NIVEAUX ÉNERGÉTIQUES

L'énergie magnétique d'un noyau dans un champ magnétique est :

$$W = -\vec{M}.\vec{B} = -M_z.B$$

(puisque $M_z = M \cos \alpha$).

Comme $M_z = m.\gamma.\frac{h}{2\pi}$, avec $-I < m < +I$, l'énergie magnétique ne peut prendre que $(2I + 1)$ valeurs

$$W = -m.\gamma.\frac{h}{2\pi}B.$$

Considérons l'exemple du proton $\left(m = -\frac{1}{2};\ m = +\frac{1}{2}\right)$. Son énergie ne pourra prendre que deux valeurs (on dit qu'il possède deux niveaux énergétiques). La différence entre ces deux niveaux est proportionnelle à B (fig. 49).

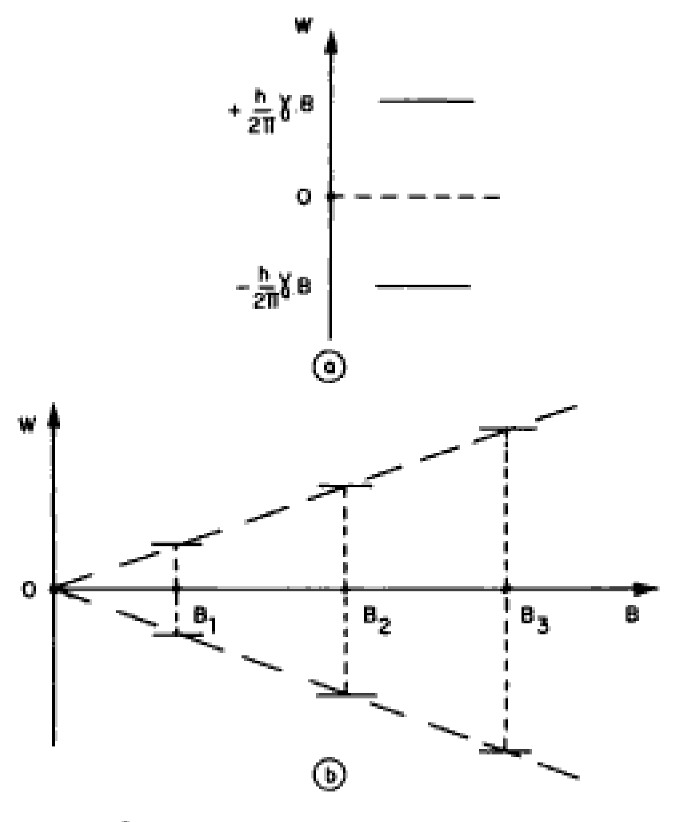


Fig. 49 Énergie magnétique du proton.

1.4.2. DISTRIBUTION DES NOYAUX SELON LEUR ÉNERGIE

Nous avons étudié (cf. tome I, III.1, 2.4) la répartition des atomes sur les niveaux excités et nous avons vu qu'à température élevée les niveaux excités n'étaient pratiquement pas peuplés. On retrouve ici des niveaux d'énergie excités; la statistique de Boltzmann indique le nombre de noyaux N_0 sur le niveau fondamental par rapport au nombre N_1 sur un niveau excité :

$$N_0 = N_1.\exp\left(\frac{hB\gamma}{2\pi kT}\right).$$

A température ordinaire, avec un champ magnétique dont on dispose habituellement (10 000 gauss = 1T), $\frac{hB\gamma}{2\pi kT} \approx 10^{-5}$ donc :

$$\exp\left(\frac{hB\gamma}{2\pi kT}\right) \approx 1 + \frac{hB\gamma}{2\pi kT} \approx 1{,}00001.$$

On peut donc dire : $N_1 \approx N_0$: *les deux niveaux du proton sont peuplés de façon égale.*

1.4.3. TRANSITION ÉNERGÉTIQUE : RÉSONANCE

Un rayonnement électromagnétique de fréquence ν peut faire passer un noyau du niveau fondamental vers le niveau excité. Cette transition énergétique ou résonance a lieu lorsque l'énergie des photons (transportés par le rayonnement électromagnétique) est égale à la différence entre deux niveaux.

$$h\nu = \Delta E = \gamma\frac{h}{2\pi}B \quad \text{(pour le proton)}$$

ou : $$\nu = \frac{\gamma.B}{2\pi} \quad (1).$$

Pour le proton : $\gamma = 2{,}67.10^4$ rad. gauss^{-1}.s^{-1}; dans un champ magnétique de 10 000 gauss, il faut donc une fréquence $\nu = 42{,}6$ MHz. Pour une telle fréquence les

protons vont absorber le rayonnement électromagnétique et passer sur un niveau supérieur : c'est la *résonance magnétique nucléaire*.

Pour d'autres noyaux, avec B = 10 000 gauss, les fréquences de résonance seront différentes :

$^{1}_{1}H$: ν = 42,58 MHz, $^{19}_{9}F$: ν = 40,06 MHz

$^{31}_{15}P$: ν = 17,24 MHz, $^{13}_{6}C$: ν = 10,71 MHz.

Nous nous intéresserons dans la suite uniquement au cas du *proton*. La relation (1) ci-dessus montre que la fréquence de résonance est proportionnelle au champ magnétique. On pourra mettre en évidence le phénomène d'absorption en faisant varier soit la fréquence ν, soit le champ magnétique B. Pour faciliter les raisonnements on considérera le champ magnétique comme seule variable, alors que, expérimentalement, on fait plutôt varier la fréquence.

2. Spectromètre de résonance magnétique nucléaire (fig. 50)

Le champ magnétique $\vec{B}$ est produit par un aimant permanent, ou mieux, par un électro-aimant. L'échantillon est placé dans l'entrefer, entouré d'une bobine au moyen de laquelle il est soumis à un rayonnement électromagnétique. L'absorption des radiations correspondant à la résonance est détectée par un récepteur, amplifiée et enregistrée. L'élément le plus important de l'appareil est l'électro-aimant qui doit fournir un champ magnétique uniforme et stable dans son entrefer.

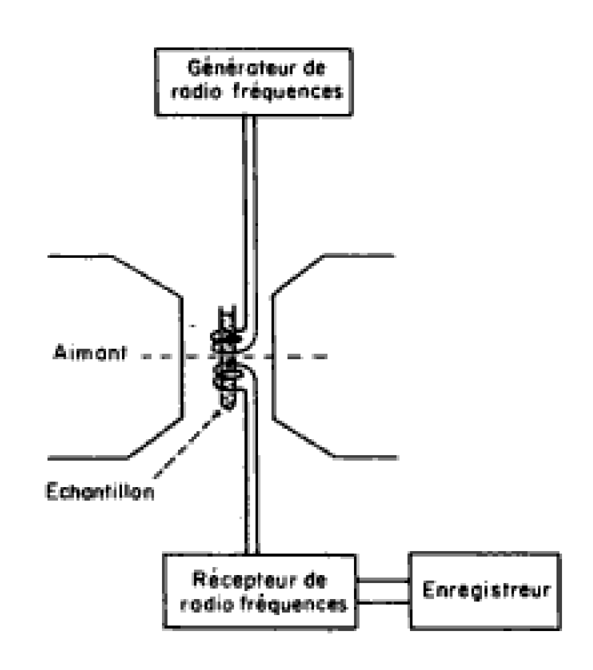


Fig. 50 Schéma d'un spectromètre RMN.

3. Étude des spectres de résonance magnétique nucléaire

3.1. EXEMPLE DE SPECTRE

On a représenté sur la figure 51 le spectre RMN de l'éthylbenzène ($C_6H_5 - CH_2 - CH_3$). On peut remarquer que les protons appartenant à des groupements différents ne résonnent pas exactement à la même valeur du champ B_0. On remarque également que les pics d'absorption ne

sont pas uniques mais formés d'ensembles de raies plus ou moins nombreuses.

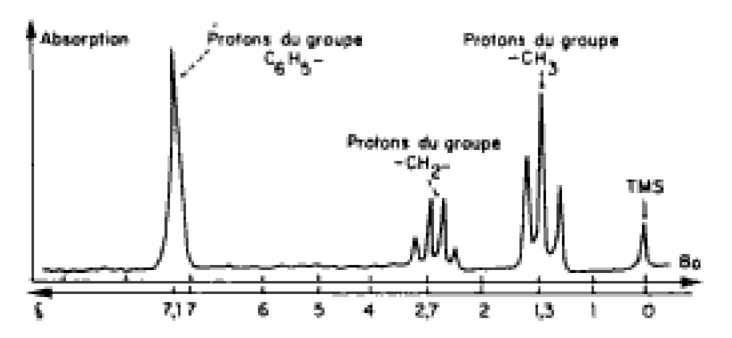


Fig. 51 Spectre RMN de $C_6H_5-CH_2-CH_3$.

Les différences des valeurs de B_0 sont relativement très petites (de l'ordre de 10^{-6} fois la valeur de B_0). On a l'habitude d'exprimer ces différences en valeur relative. On introduit une grandeur appelée *déplacement chimique*, δ, différence relative de résonance d'un proton par rapport à un groupement de référence. On choisit comme référence le tétraméthylsilane (TMS), dont la formule est :

$$CH_3 - \underset{CH_3}{\overset{CH_3}{Si}} - CH_3.$$

Ce composé, qui possède un seul type de protons, a la propriété de résonner à une grande valeur de champ magnétique B_0, qu'on choisit comme référence, Bréf. Le déplacement chimique sera défini par la relation suivante, pour un proton résonnant à la valeur B_0 :

$$\delta = \frac{(\text{Bréf.} - B_0)}{\text{Bréf.}} . 10^6.$$

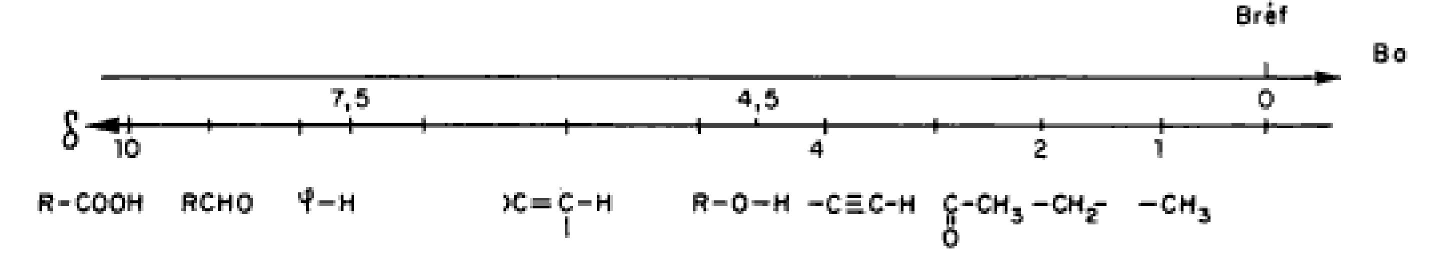
En général δ varie entre 0 et 15 unités ; on l'exprime en ppm (parties par million). On a indiqué sur la figure 51 l'échelle des déplacements chimiques δ dont l'origine est le pic correspondant au TMS.

On peut remarquer enfin que les pics n'ont pas tous la même hauteur. La surface des pics est proportionnelle au nombre de protons du groupe qui résonne. Un intégrateur permet de mesurer cette surface et donne donc des renseignements sur les nombres relatifs des protons des différents groupements.

3.2. ÉTUDE DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES

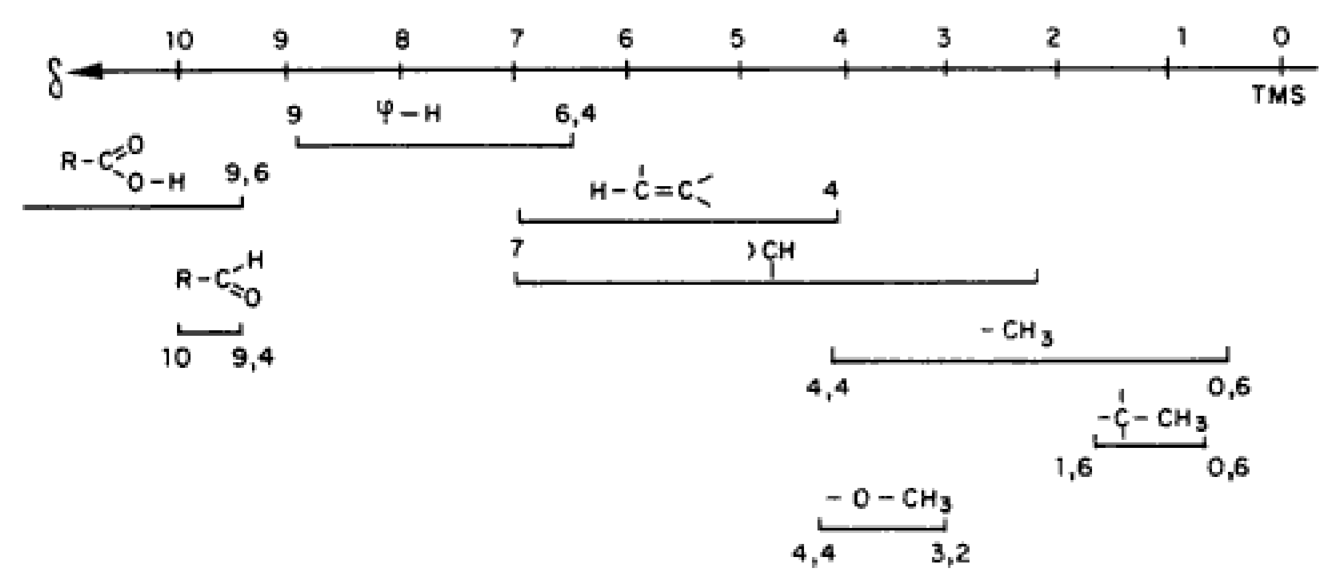
Le champ magnétique que l'on mesure est B_0, c'est-à-dire le champ magnétique *extérieur*. Or la résonance a lieu au niveau des protons, c'est-à-dire au niveau des *noyaux* des atomes. Pour y arriver les forces magnétiques ont à traverser les nuages électroniques qui entourent ces noyaux et qui constituent une espèce de carapace protectrice, un blindage des noyaux. Le champ magnétique effectivement « ressenti » par le noyau sera de la forme $B_0(1 - \sigma)$ où σ est une constante d'écran qui va dépendre du site où est placé le proton qui résonne. Si les protons sont liés à des éléments électronégatifs, ceux-ci exercent une attraction sur les électrons et diminuent le blindage des protons qui résonnent ainsi pour une valeur plus faible du champ magnétique extérieur.

On peut donner quelques valeurs moyennes de déplacements chimiques δ (une augmentation de blindage correspondant à une diminution de δ).



En fait, ces valeurs représentent des valeurs moyennes ; en effet, les déplacements chimiques varient suivant l'environnement du groupement chimique étudié. Pour chaque groupement on indique alors un intervalle possible de δ.

Exemples :



Beaucoup d'intervalles se chevauchent donc et on ne peut pas identifier un groupement uniquement par la valeur du déplacement chimique observé. On verra que le nombre de pics, la surface de ceux-ci, et la valeur du déplacement chimique permettent d'identifier de nombreux groupements.

Remarque : diamagnétisme benzénique :

On remarque, sur le tableau des déplacements chimiques, que les protons benzéniques résonnent à champ faible (δ compris entre 6,4 et 9). On peut expliquer ce fait en envisageant l'action du champ magnétique B_0 sur les électrons de l'orbitale π moléculaire. Le champ B_0 provoque un courant dans cette orbitale π, qui crée un champ magnétique induit B_i dont on a représenté sur la figure 52 les lignes de champ. Au niveau des électrons de l'orbitale π, le champ induit s'oppose à B_0 ; au niveau des protons, à l'extérieur de la molécule, le champ induit B_i *s'ajoute* à B_0. La résonance de tels protons nécessite donc un champ extérieur B_0 plus faible. Il lui correspond alors un déplacement chimique plus grand.

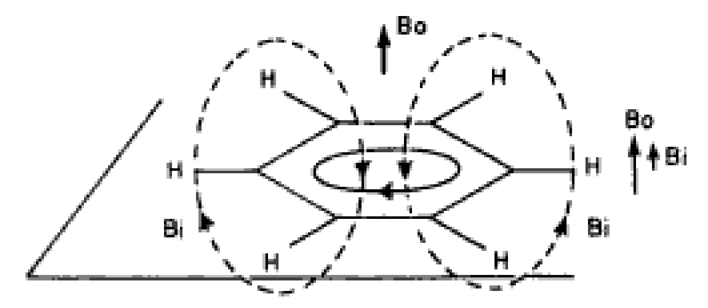


Fig. 52 Diamagnétisme benzénique.

3.3. COUPLAGE SPIN-SPIN

On appelle *couplage spin-spin* une interaction entre les protons de sites voisins, qui explique la multiplicité des pics d'un groupement donné. Cette interaction est due au fait que chaque proton se comporte comme un petit aimant qui peut être orienté soit dans le sens du champ magnétique extérieur B_0, soit dans le sens contraire. Dans les deux cas ce petit aimant crée un champ magnétique en son voisinage ; ce champ peut s'ajouter ou se retrancher à B_0. On obtient donc des effets que l'on va expliquer sur différents exemples.

3.3.1. PRÉSENCE D'UN VOISIN (fig. 53)

Soit l'ensemble :

$$- \overset{|}{\underset{|}{CH}} - CH_3$$
(b) (a)

intéressons-nous à la résonance des protons *a*.

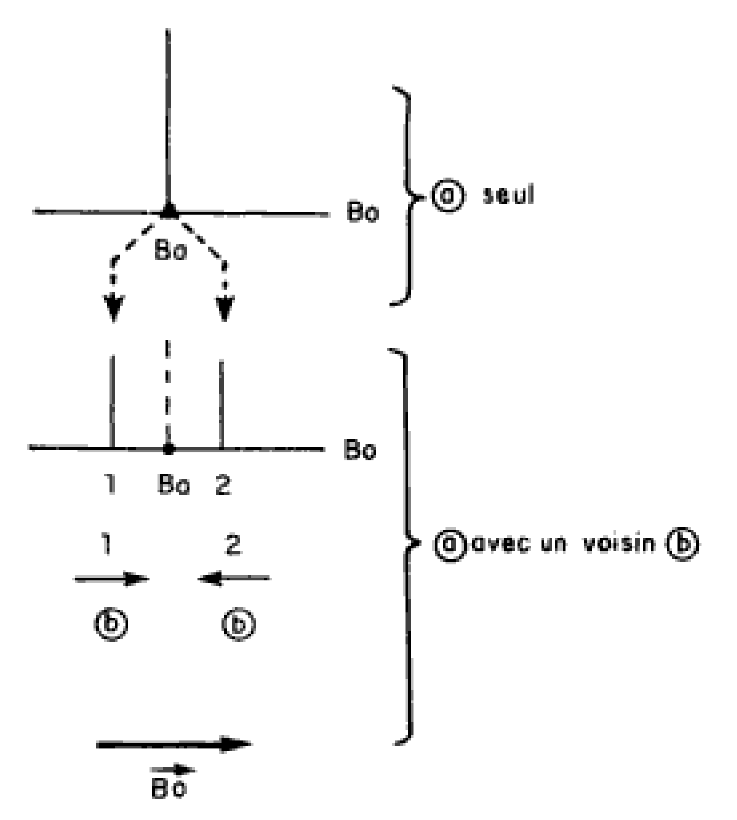


Fig. 53 Couplage avec un voisin.

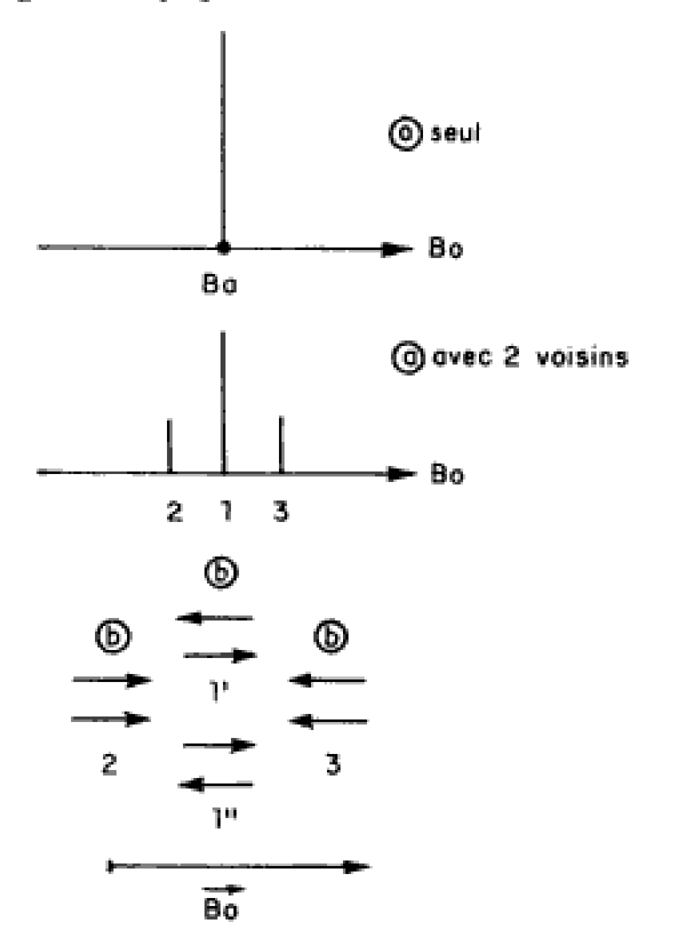


Fig. 54 Couplage avec deux voisins.

Si ces protons *a* étaient seuls (en absence du proton *b* voisin), ils résonneraient pour une valeur du champ B_a (singulet). En présence du proton *b* voisin, le champ magnétique créé par celui-ci peut s'ajouter ou se retrancher à B_a selon que le petit aimant qu'il représente est dans le sens ou en sens contraire de $\overrightarrow{B_0}$. Si le proton *b* est dans le sens de $\overrightarrow{B_0}$ (cas 1) la résonance de *a* nécessite un champ plus faible (pic n° 1) ; si le proton *b* est en sens inverse de $\overrightarrow{B_0}$ (cas 2) la résonance du proton *a* nécessite un champ B_0 plus grand (pic n° 2). La probabilité de trouver le proton *b* dans un sens ou dans l'autre étant la même à température ordinaire, on obtient deux pics de résonance de *a d'égale intensité* (doublet).

3.3.2. PRÉSENCE DE DEUX VOISINS

Considérons l'ensemble :

```
      H
      |
  – C – CH₃
      |    (a)
      H
     (b)
```

Intéressons-nous encore aux protons du site *a* ; on voit que la présence de deux voisins *b* provoque l'apparition de 3 pics (fig. 54).

– *Pic n°* 1 : les deux protons *b* sont en sens inverse l'un de l'autre ; leurs effets s'annulent. La résonance de *a* a lieu pour la même valeur de B. Cette configuration peut se présenter de deux façons différentes (1' et 1").

– *Pic n°* 2 : les deux protons *b* sont dans le même sens, et dans le sens du champ magnétique extérieur $\overrightarrow{B_0}$. Ils s'ajoutent donc à celui-ci ; la résonance du proton *a* nécessite alors un champ plus faible B_2. Le pics correspondant est deux fois plus faible que le pic n° 1, car il n'existe qu'une configuration possible de type 2, alors qu'il en existait 2 pour le type 1 (1' et 1").

– *Pic n° 3* : les deux protons *b* sont dans le même sens, mais en sens inverse du champ magnétique extérieur $\overrightarrow{B_0}$. Ils se retranchent donc à celui-ci ; la résonance du proton *a* nécessite alors un champ plus intense B_3. Là encore, le pic aura la même intensité que le n° 2 car il n'existe qu'une configuration possible de type 3.

Deux voisins donnent donc naissance à un *triplet* dont les intensités relatives sont dans le rapport 1 : 2 : 1.

3.3.3. PRÉSENCE DE TROIS VOISINS

La figure 55 explique l'allure du spectre obtenu lorsqu'un proton donné se trouve en présence de trois voisins. On voit apparaître un *quadruplet* ; le nombre de configurations de chaque type indique le rapport des intensités de chaque pic : 1 : 3 : 3 : 1. De façon générale, la présence de *n* voisins provoque l'apparition de (*n* + 1) pics.

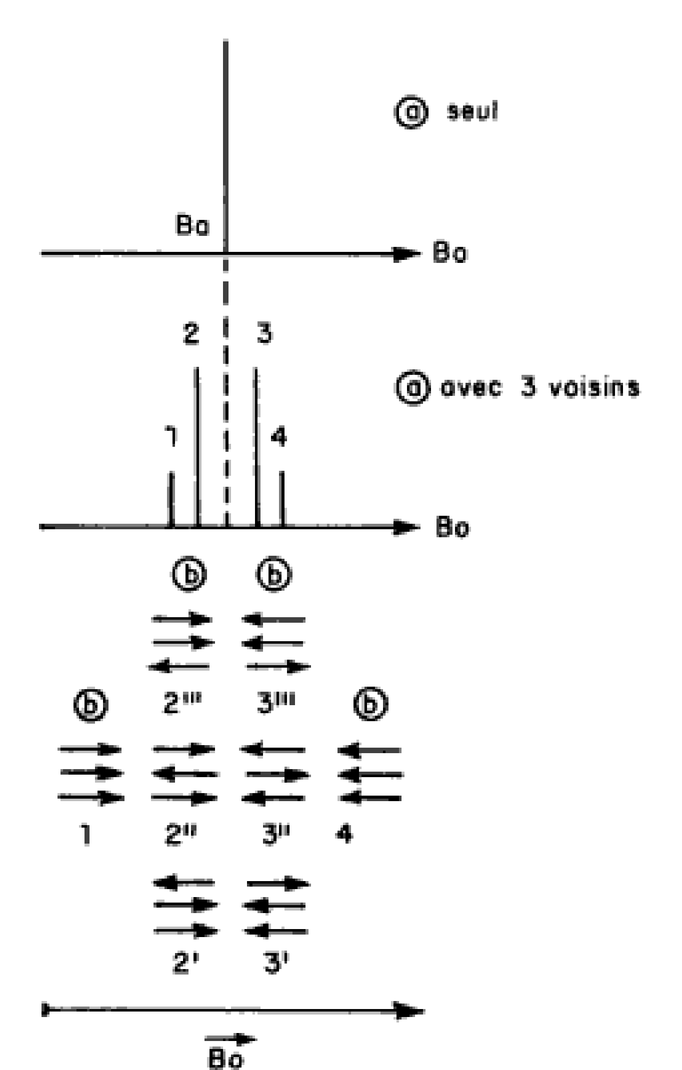


Fig. 55 Couplage avec trois voisins.

3.3.4. CARACTÉRISTIQUES ESSENTIELLES DU COUPLAGE

Le couplage n'existe qu'entre des protons :

– *voisins* (portés par des atomes de carbone adjacents),

– *non équivalents* (dont le déplacement chimique est différent).

Exemples :

1) Il n'y a pas de couplage entre les protons *a* et *b*, puisqu'ils sont équivalents. On observe donc un seul pic, dans le spectre du dibromo-1,2 éthane.

(*a*) (*b*)
$CH_2 - CH_2$
| |
Br Br

2) Les protons *a* et *b* possèdent le même déplacement chimique (ils sont donc équivalents). Les protons *c* sont différents. En revanche il n'y a pas de couplage, car les protons *a* et *b*, d'une part, et *c*, d'autre part, ne sont pas voisins.

Cl
|
$H_3C - C - CH_2Cl$
(*a*) | (*c*)
CH_3
(*b*)

3) Les protons *a* et *b* sont distincts (*cis* et *trans*, par rapport à CH_3) ; ils sont donc couplés.

H_3C H(*a*)
$\rangle C = C \langle$
Cl H (*b*)

3.3.5. QUELQUES EXEMPLES

On représente dans les spectres, chaque pic par un segment dont la hauteur est proportionnelle à la surface du pic correspondant.

3.3.5.1. Éthanal (fig. 56)

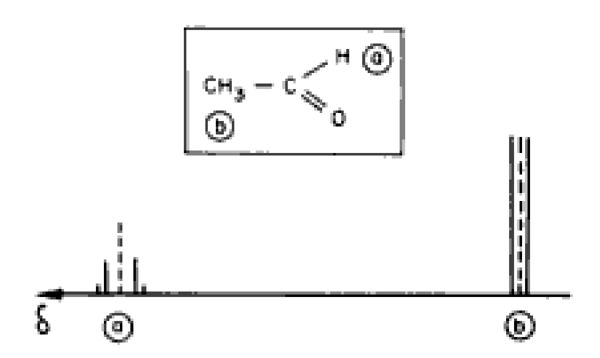


Fig. 56 Spectre de l'éthanal.

3.3.5.2. Butanone (fig. 57)

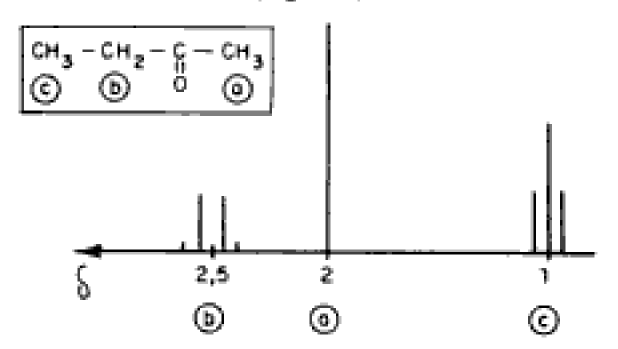


Fig. 57 Spectre de la butanone.

3.3.5.3. Éthanol pur (fig. 58)

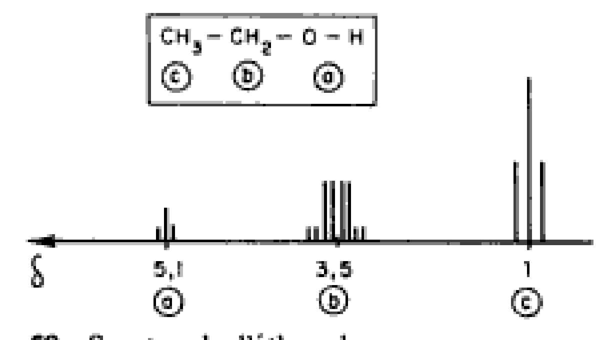


Fig. 58 Spectre de l'éthanol pur.

Le spectre de l'éthanol pur présente un multiplet du groupe méthylène $-CH_2-$; on peut l'expliquer en envisageant deux couplages spin-spin différents :

– couplage avec le CH_3 qui donne un quadruplet 1 : 3 : 3 : 1 ;

– couplage avec OH qui dédouble chaque raie du quadruplet précédent. La présence de l'oxygène modifie en effet le couplage entre les protons voisins qui sont alors différents.

3.4. ÉCHANGE CHIMIQUE

Les molécules qui possèdent un groupement hydroxyle se signalent par la présence d'un atome d'hydrogène labile, susceptible de participer à des liaisons hydrogène et de s'échanger entre différentes molécules. Lorsque cet échange a lieu, le couplage entre le proton labile et les protons voisins n'existe plus. Aussi, le spectre de l'éthanol en présence d'une trace d'acide (ions H^+) a cet aspect simplifié de la figure 59. Il n'y a plus de couplage entre le méthylène $-CH_2-$ et le groupement hydroxyle $-OH$. Le proton hydroxylique s'échange plus facilement avec d'autres molécules en présence d'ions H^+ qui jouent le rôle de catalyseur.

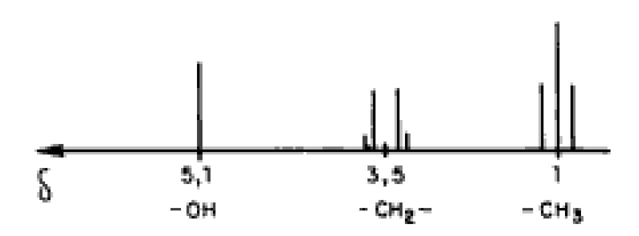


Fig. 59 Éthanol en présence de H^+.

4. Applications de la résonance magnétique nucléaire

L'application la plus importante est, en analyse qualitative, la détermination de la formule ou de la géométrie d'une molécule. Avec les figures 60 et 61 nous avons deux exemples, simples, de spectres de substances dont on ne donne que la formule brute. Dans la figure 60, on note la présence d'un pic ($\delta = 7{,}2$) correspondant à 5 protons (groupement phényl C_6H_5-), d'un quadruplet ($\delta = 2{,}7$) correspondant à 2 protons ($-CH_2-$) et d'un triplet ($\delta = 1{,}3$) correspondant à 3 protons ($-CH_3$). La formule du composé est alors obtenue sans aucun doute, c'est-à-dire $C_6H_5-CH_2-CH_3$. On pourra montrer que la formule du composé de la figure 61 est $C_6H_5-\underset{\underset{\textstyle O}{\|}}{C}-CH_3$.

Les spectres RMN permettent ainsi de confirmer les formules que laissent prévoir les spectres infrarouge. On se reportera à la partie I.1, 3.2 où ont été étudiés les spectres infrarouge des deux substances ci-dessus.

Il faut préciser que, dans le cas de molécules complexes, la résonance magnétique nucléaire du proton est souvent remplacée par celle du ^{13}C.

On peut également utiliser la RMN à des fins quantitatives; cette application est basée sur le fait que l'aire du signal, dû à un type de protons, est proportionnelle au nombre de protons. Après comparaison avec une quantité de substance donnée, on peut déterminer la concentration d'une solution.

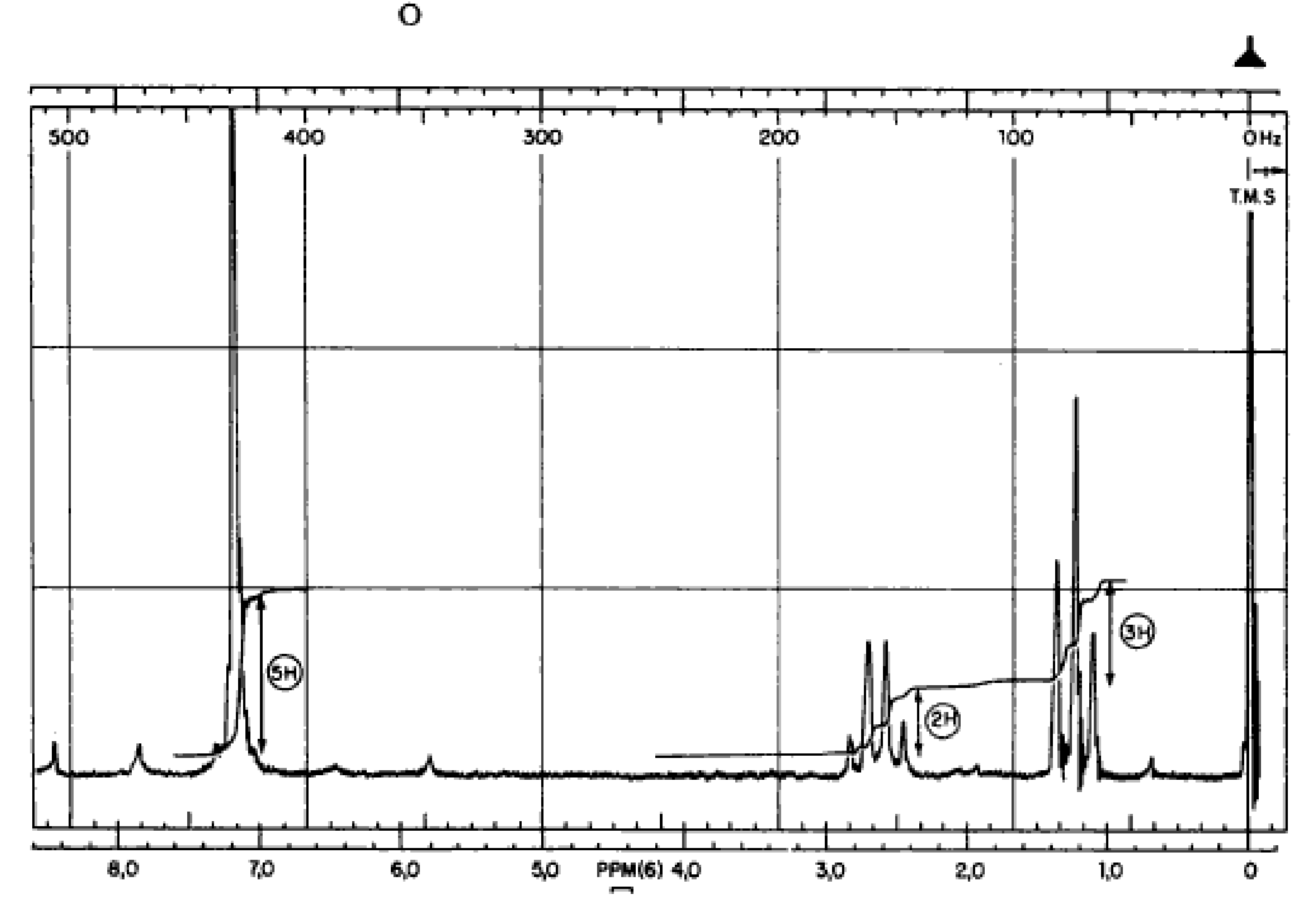


Fig. 60 Spectre RMN du composé : C_8H_{10}.

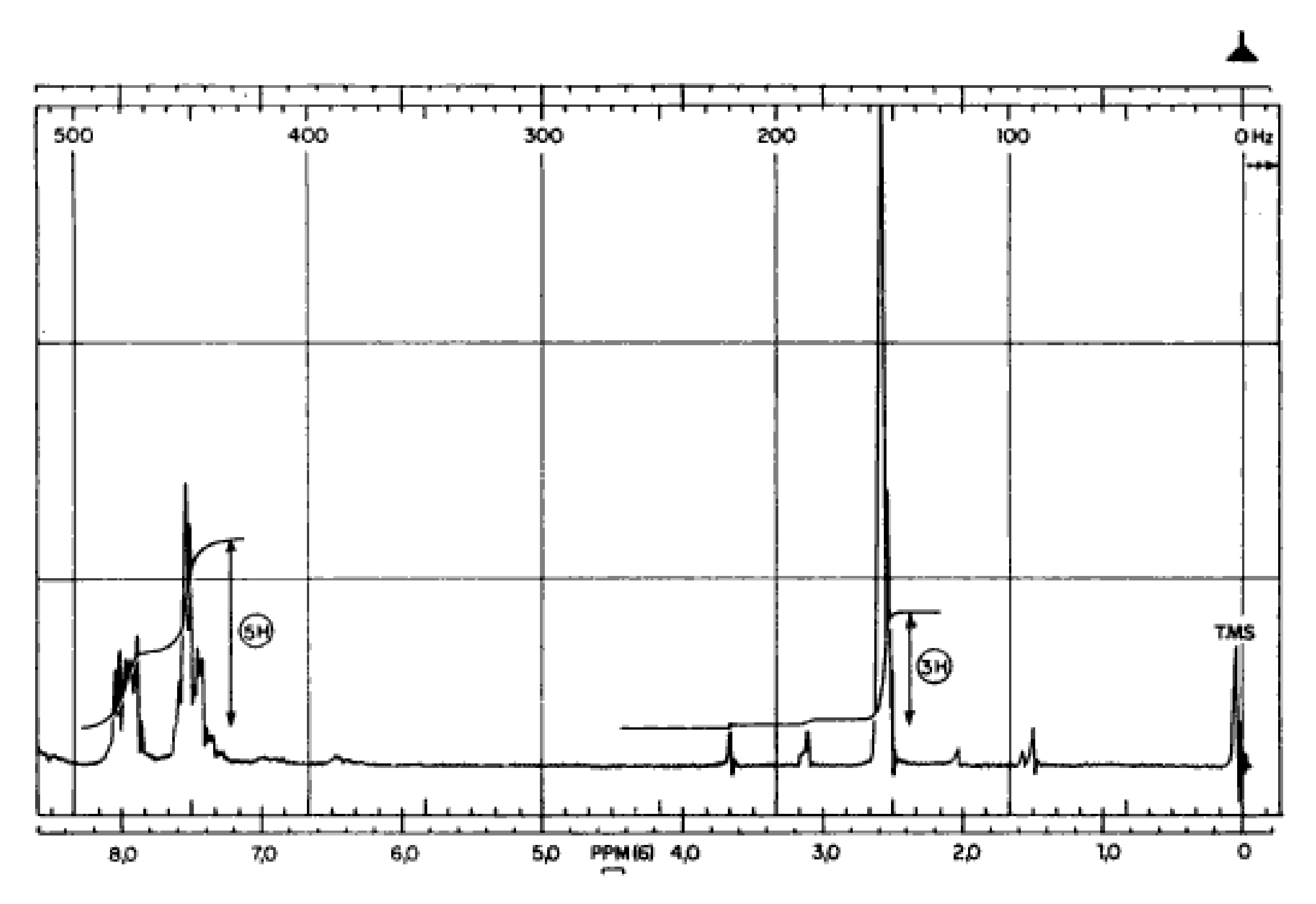


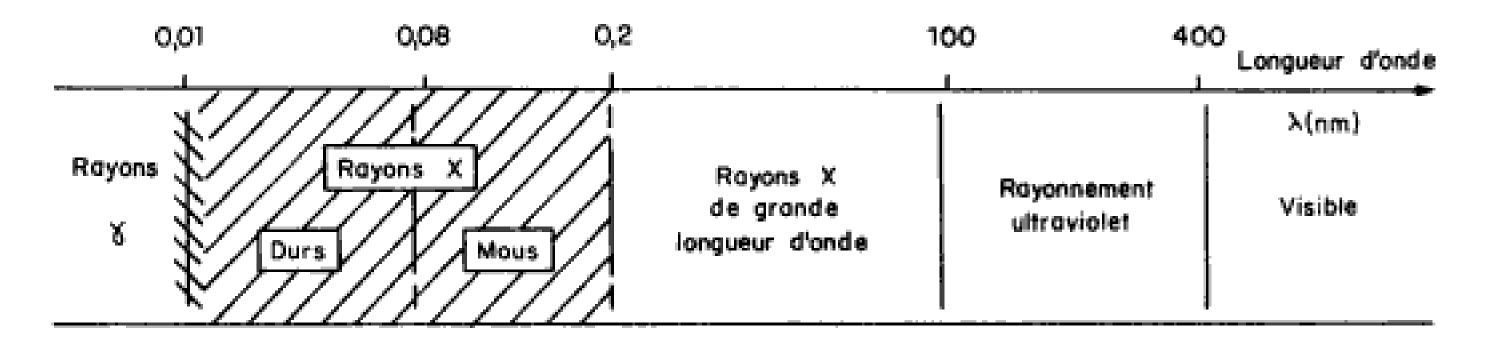
Fig. 61 Spectre RMN du composé : C_8H_8.

I.5. Diffraction des rayons X

Dans l'échelle des ondes électromagnétiques, les rayons X se situent à la suite des radiations ultraviolettes, en se déplaçant vers les courtes longueurs d'onde. Les rayons X utilisés dans la pratique appartiennent à un domaine assez restreint, compris entre 0,01 et 0,2 nm.

Les rayons X compris dans l'intervalle [0,2 – 100 nm] se différencient des rayons X ordinaires par certaines propriétés, la plus importante est leur extrême absorbabilité par l'air. Cette facilité d'absorption persiste encore jusqu'à 0,08 nm environ ; les rayons X correspondants sont appelés *mous*; le terme de rayons X *durs* est réservé aux rayons pénétrants, de longueurs d'onde comprise entre 0,01 et 0,08 nm.

La frontière entre les rayons γ et les rayons X est très diffuse. On peut trouver des rayons γ et des rayons X, de même longueur d'onde, donc parfaitement identiques. La seule différence provient de leur mode de formation, les rayons γ ayant une origine nucléaire alors que les rayons X ont une origine électronique.



1. Production et origine des rayons X

La production de rayons X est un phénomène *d'émission*, par un solide métallique bombardé par un faisceau d'électrons ayant une énergie suffisante. Cette émission est essentiellement un phénomène atomique, conséquence de perturbations très profondes (électrons des couches internes) subies par l'atome bombardé.

1.1. GÉNÉRATEURS DE RAYONS X

Le tube de Coolidge représente un générateur traditionnel formé d'un tube à vide dans lequel le faisceau d'électrons est produit par émission thermoélectronique : un filament porté à haute température par un courant électrique auxiliaire joue le rôle de cathode émissive d'électrons (fig. 63). Ces électrons sont accélérés par un champ électrique. A cet effet, on établit une différence de potentiel de 10^4 à 10^5 volts entre la cathode et une autre électrode appelée *anticathode*. Cette dernière est une cible pour les électrons ; elle est souvent réalisée par une masse de tungstène taillée à 45°. La caractéristique courant-tension est représentée figure 62. L'intensité à saturation dépend de la température du filament. Elle va déterminer le flux de rayons X.

La valeur de la tension V détermine la limite

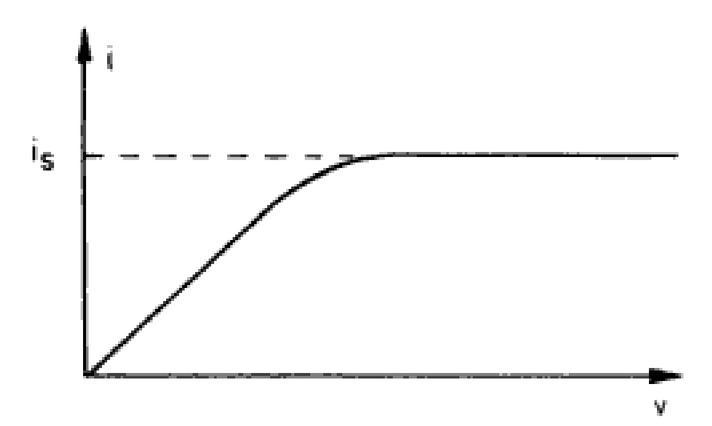


Fig. 62 Caractéristique d'un tube à rayons X.

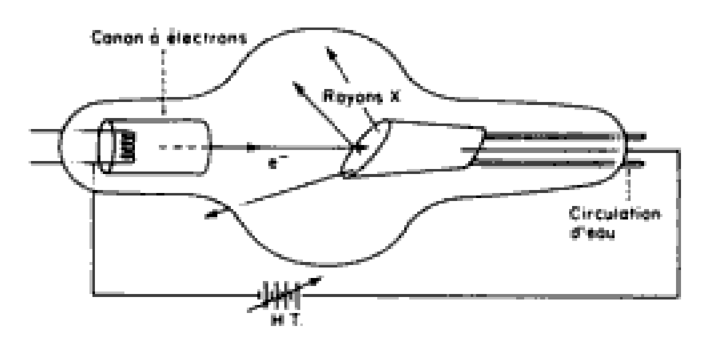


Fig. 63 Tube de Coolidge.

de longueur d'onde du spectre continu (1.2) donc le pouvoir pénétrant des rayons X.

L'échauffement de l'anticathode peut être diminué par un circuit de refroidissement ; on réalise aussi des anodes tournantes qui peuvent dissiper plus facilement la chaleur due aux chocs des électrons.

On utilise maintenant des accélérateurs de particules, qui permettent d'obtenir un faisceau d'électrons très énergétiques. Ils donnent ainsi naissance, après collision sur une cible métallique, à des rayons X très durs.

1.2. ALLURE DU SPECTRE D'ÉMISSION

Dans le cas le plus général où les rayons X sont émis par l'anticathode d'une ampoule à haute tension, l'analyse du rayonnement révèle deux parties dans le spectre (fig. 64) :

– une partie *continue*, formée d'une suite ininterrompue de longueurs d'onde ;

– un petit nombre de *raies* de longueurs d'onde bien précises.

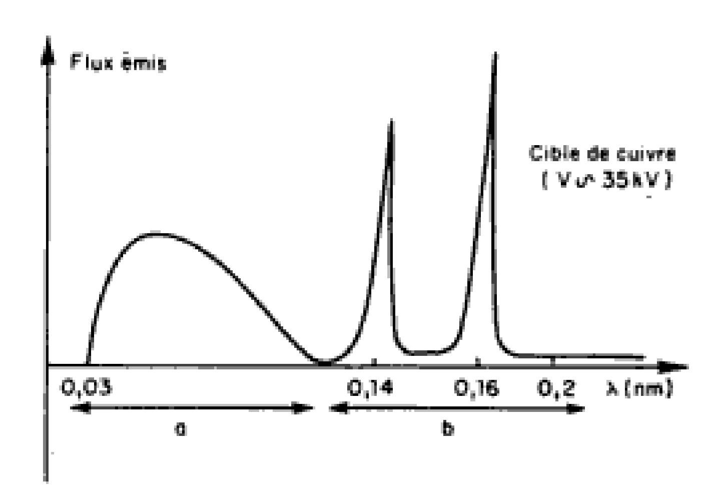


Fig. 64 Spectre d'émission X du cuivre. *a*) Le spectre continu dépend essentiellement de la tension accélératrice. *b*) Le spectre de raies dépend de la nature de l'anticathode.

Le spectre continu dépend essentiellement de la tension accélératrice ; lorsque celle-ci augmente :

– le flux émis augmente ;

– les longueurs d'onde sont déplacées vers les faibles valeurs (rayons plus durs).

Ainsi, avec une cible en tungstène :

– V = 20 kV, $\lambda_{max.}$ = 0,07 nm ;

– V = 50 kV, $\lambda_{max.}$ = 0,05 nm avec un flux émis dix fois plus important.

On considère que cette partie du spectre est due au freinage des électrons qui, perdant leur énergie, produisent une émission de rayonnement (Bremsstrahlung).

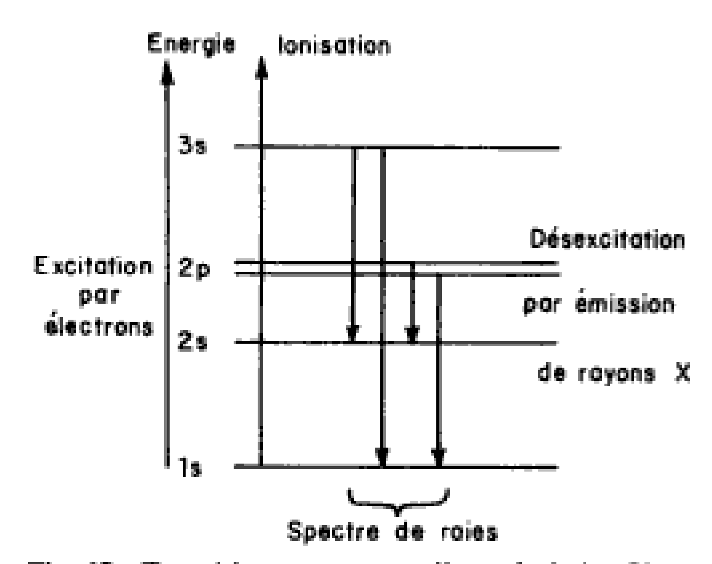


Fig. 65 Transitions au cours d'une émission X.

La longueur d'onde des raies (spectre discontinu) est caractéristique de l'élément qui constitue l'anticathode. L'émission est produite par des transitions énergétiques dépendant de la structure interne de l'atome. Avec le cuivre, par exemple, on observe deux raies internes à 0,154 et 0,139 nm.

Les transitions énergétiques sont observées pour les électrons des couches internes (1*s*, 2*s*, 2*p* ...) des atomes lourds possédant donc un grand nombre d'électrons (fig. 65).

Les couches des atomes lourds étant saturées, de telles transitions ne sont permises que si une couche interne est rendue vacante par l'expulsion, immédiatement antérieure, de l'électron (cf. I.2, 3.3).

2. Diffraction des rayons X par les cristaux

Les rayons X peuvent être diffusés par les atomes, de la même façon que des particules plus grosses (colloïdes, par exemple) peuvent diffuser des radiations de plus grande longueur d'onde. Un ensemble d'atomes, irradié, par un faisceau de rayons X va se comporter comme un ensemble de sources secondaires dont les rayonnements vont interférer. La diffraction est donc un cas particulier de diffusion dans le cas où les rayonnements, dans une direction donnée, ne seront pas toujours en phase et pourront donc être détruits mutuellement.

Si les rayons X jouent un rôle important, c'est que leur longueur d'onde est du même ordre de grandeur que les distances interatomiques dans les molécules et dans les cristaux.

Fig. 66 Schématisation de différentes familles réticulaires.

2.1. STRUCTURE CRISTALLINE : NOTION DE PLAN RÉTICULAIRE

Dans un cristal, les atomes (molécules ou ions) sont disposés de manière régulière (fig. 66); la maille est le plus petit volume dont la répétition dans trois directions données permet de constituer le cristal. On peut également définir dans le cristal, des plans parallèles, équidistants, passant par tous les atomes; ce sont les plans *réticulaires*. On peut montrer sur un ensemble d'atomes disposés dans un plan qu'il existe un grand nombre de familles de plans réticulaires.

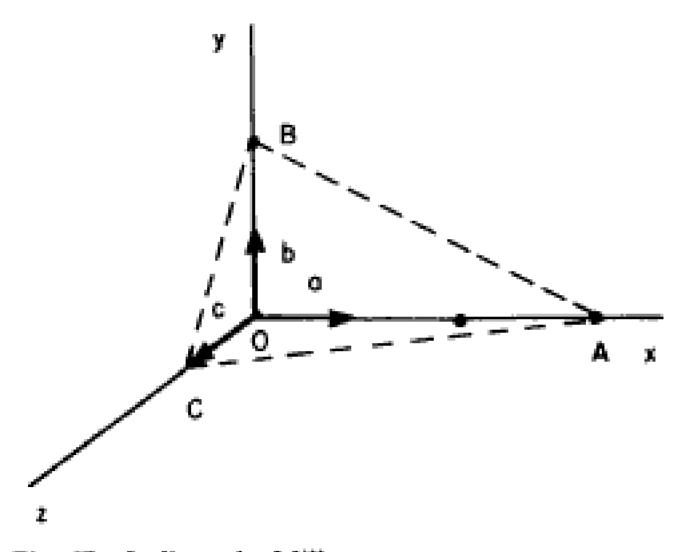


Fig. 67 Indices de Miller.

Pour désigner chaque famille de plans réticulaires, on utilise les indices de Miller. On choisit un atome comme origine et trois axes de coordonnées Ox, Oy, Oz, avec chacun un vecteur unitaire $\vec{a}$, $\vec{b}$ et $\vec{c}$ (fig. 67). Un plan, d'une famille ne passant pas par O, coupe les trois axes en A, B et C dont les coordonnées sont x, y, z. Les indices de Miller sont les nombres h, k, l, *entiers*, définis par : $h = K\frac{1}{x}$; $k = K\frac{1}{y}$; $l = K\frac{1}{z}$; K étant choisi pour que les 3 indices soient des nombres entiers. Dans notre exemple : $x = 3$, $y = 2$, $z = 1$.

$$\frac{1}{x} = \frac{1}{3}; \quad \frac{1}{y} = \frac{1}{2}; \quad \frac{1}{z} = 1$$

si on choisit $K = 6$; $h = 2$; $k = 3$; $l = 6$.

La famille de plans réticulaires correspondant sera désignée par (2, 3, 6).

Exemple :

On peut donner quelques indices de Miller de plans réticulaires d'un système cubique (fig. 68).

2.2. LOI DE BRAGG

La diffraction des rayons X par les cristaux rappelle la diffraction de la lumière par les réseaux optiques utilisés en spectrophotométrie. Mais l'étude théorique est plus difficile, car on a ici un réseau spatial et non plus plan.

Nous résumerons les résultats de cette étude théorique :

– *chaque plan réticulaire* se comporte comme un miroir et produit une *réflexion* des rayons X avec un angle de réflexion égal à l'angle d'incidence. La réflexion a lieu au niveau de chaque atome (ou molécule); dans l'espace compris entre ces atomes le plan réticulaire est transparent ;

– les rayons X réfléchis par une *famille de plans réticulaires* (fig. 69) interfèrent et vont se détruire mutuellement, sauf pour certaines directions où on observera un renforcement du faisceau réfléchi. On peut montrer que la différence de marche entre deux rayons réfléchis sur deux plans réticulaires voisins est : $\delta = 2d \sin\theta$. Ces rayons réfléchis seront en phase si la différence de marche est égale à un nombre entier de longueur d'onde λ. On obtient

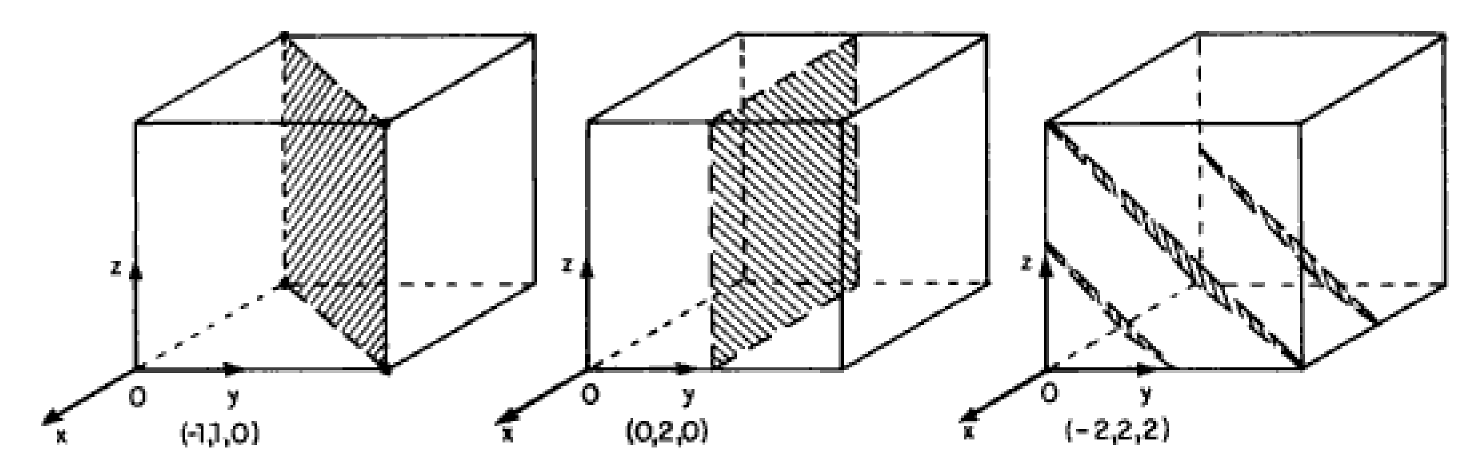


Fig. 68 Quelques plans réticulaires du système cubique.

Les distances entre deux plans réticulaires voisins, appartenant à la même famille sont appelées *distances inter-réticulaires*. Elles peuvent être calculées en fonction de l'arête de la maille et des indices de Miller de la famille de plans considérée.

la relation de Bragg indiquant les directions θ pour lesquelles on a un maximum de flux de rayons X :

$$2d \sin\theta = n\lambda$$

n, nombre entier, est l'ordre de diffraction.

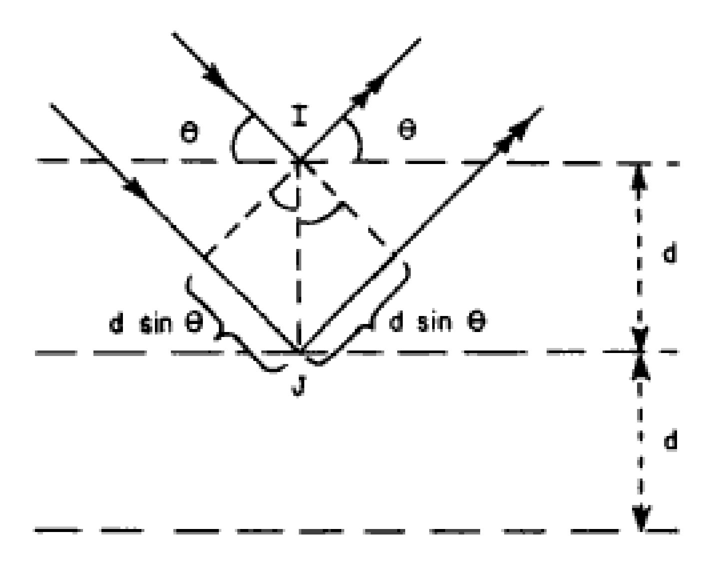


Fig. 69 Diffraction des rayons X.

2.3. DIFFÉRENTES MÉTHODES D'ÉTUDE CRISTALLINE

La diffraction des rayons X par les cristaux permet à la fois l'étude du faisceau de rayons (mesure des longueurs d'onde λ) et celle du cristal. Ce phénomène faisant intervenir les électrons des atomes, les figures de diffraction obtenues donnent des renseignements sur la densité électronique dans les atomes et les molécules et, par suite, permettent de déterminer la structure des molécules.

2.3.1. MÉTHODE DE LAUE (fig. 70)

On utilise un monocristal fixe recevant un faisceau de rayons X polychromatique. Chaque

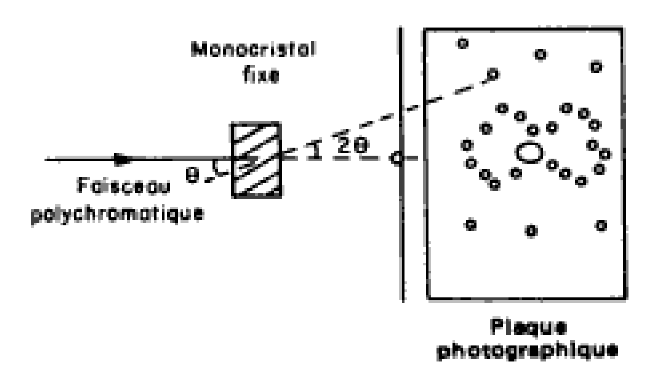


Fig. 70 Méthode de Laue.

famille de plans réticulaires voit arriver le faisceau sous un angle θ différent. Pour chacune de ces valeurs, il correspond une longueur d'onde vérifiant la loi de Bragg, donc une tache de diffraction sur la plaque photographique. Au centre, une tache importante est produite par le rayonnement qui a traversé le cristal sans déviation. Les clichés obtenus donnent des renseignements précis sur la symétrie des cristaux et la structure électronique des molécules.

2.3.2. MÉTHODE DU CRISTAL TOURNANT (fig. 71)

On envoie sur un monocristal tournant un faisceau de rayons X monochromatique λ. On obtient des séries de réflexions chaque fois qu'il se

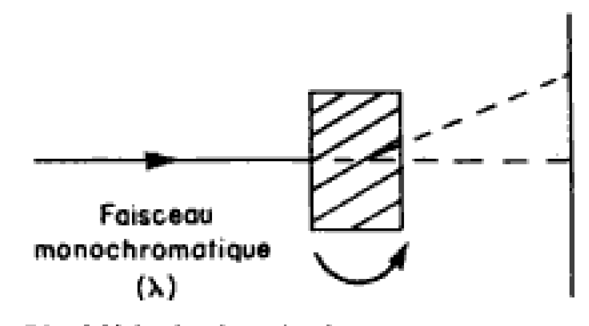


Fig. 71 Méthode du cristal tournant.

trouve une famille de plans réticulaires (caractérisée par la distance inter-réticulaire *d*) sur lesquels l'angle d'incidence θ vérifie la loi de Bragg. A chaque tache correspond une famille de plans réticulaires. On a conçu les dispositifs mécaniques qui font tourner à la fois le cristal et le cliché.

2.3.3. MÉTHODE DES POUDRES (fig. 72)

Les deux méthodes ci-dessus utilisent des monocristaux, parfois difficiles à préparer. On emploie alors une poudre sur laquelle on envoie un faisceau monochromatique.

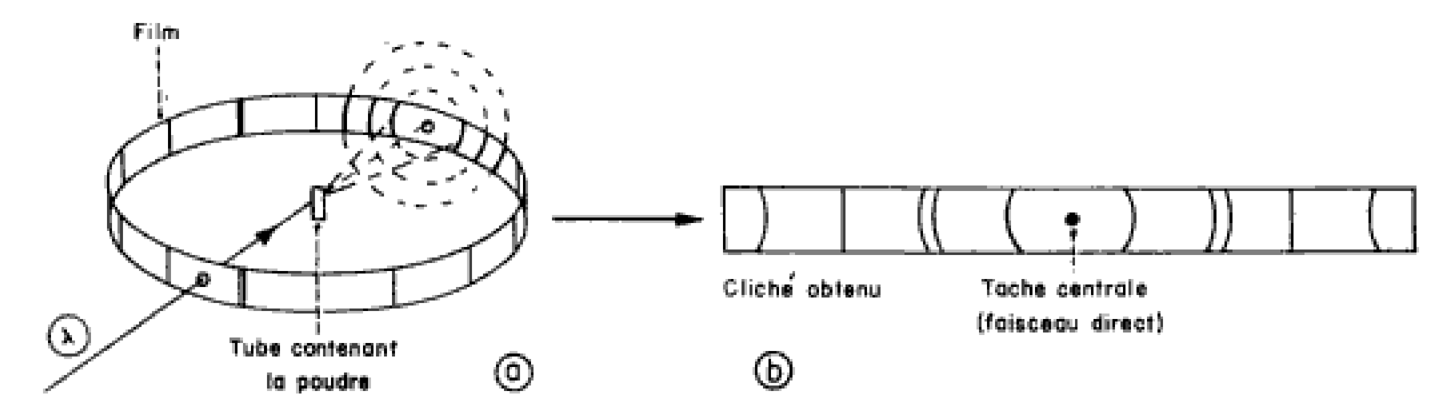


Fig. 72 Méthode des poudres.

Statistiquement les grains peuvent prendre toutes les orientations possibles. Les taches de diffraction apparaissent pour des angles θ (mesurables) vérifiant la relation de Bragg pour une famille de plans réticulaires de distance *d* ainsi calculable.

3. Applications

L'analyse des clichés obtenus donnent un très grand nombre d'angles de diffraction correspondant aux différents atomes du cristal. Seuls les atomes d'hydrogène ne peuvent pas être mis en évidence facilement par cette méthode.

Le problème consiste alors à confronter les résultats expérimentaux avec ceux que l'on obtiendrait théoriquement avec une molécule hypothétique. Les calculs, longs, et fastidieux, ne peuvent être réalisés que si l'on a à sa disposition un bon ordinateur.

I.6. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse consiste à analyser les fragments chargés issus d'une molécule soumise à un phénomène d'ionisation et séparés selon leur masse. Cette technique dérive des expériences de J.-J. Thomson qui lui permirent de découvrir les isotopes du néon, au moyen des célèbres paraboles obtenues sur une plaque photographique.

1. Spectromètre de masse (fig. 73)

Le spectromètre de masse comporte :

– *une source d'ions*, enceinte dans laquelle la molécule à étudier est ionisée, soit en la bombardant par un faisceau d'électrons, soit en la portant à haute température au contact d'un filament incandescent (thermo-ionisation);

– *une chambre d'accélération*, où on communique aux ions formés une vitesse importante. Certains appareils possèdent un filtre de vitesse permettant, à des ions de masse différente, d'acquérir la même vitesse;

– *un système dispersif*, où les ions de masse différente sont séparés;

– *un récepteur*, qui collecte les ions et mesure leur nombre en fonction de leur masse.

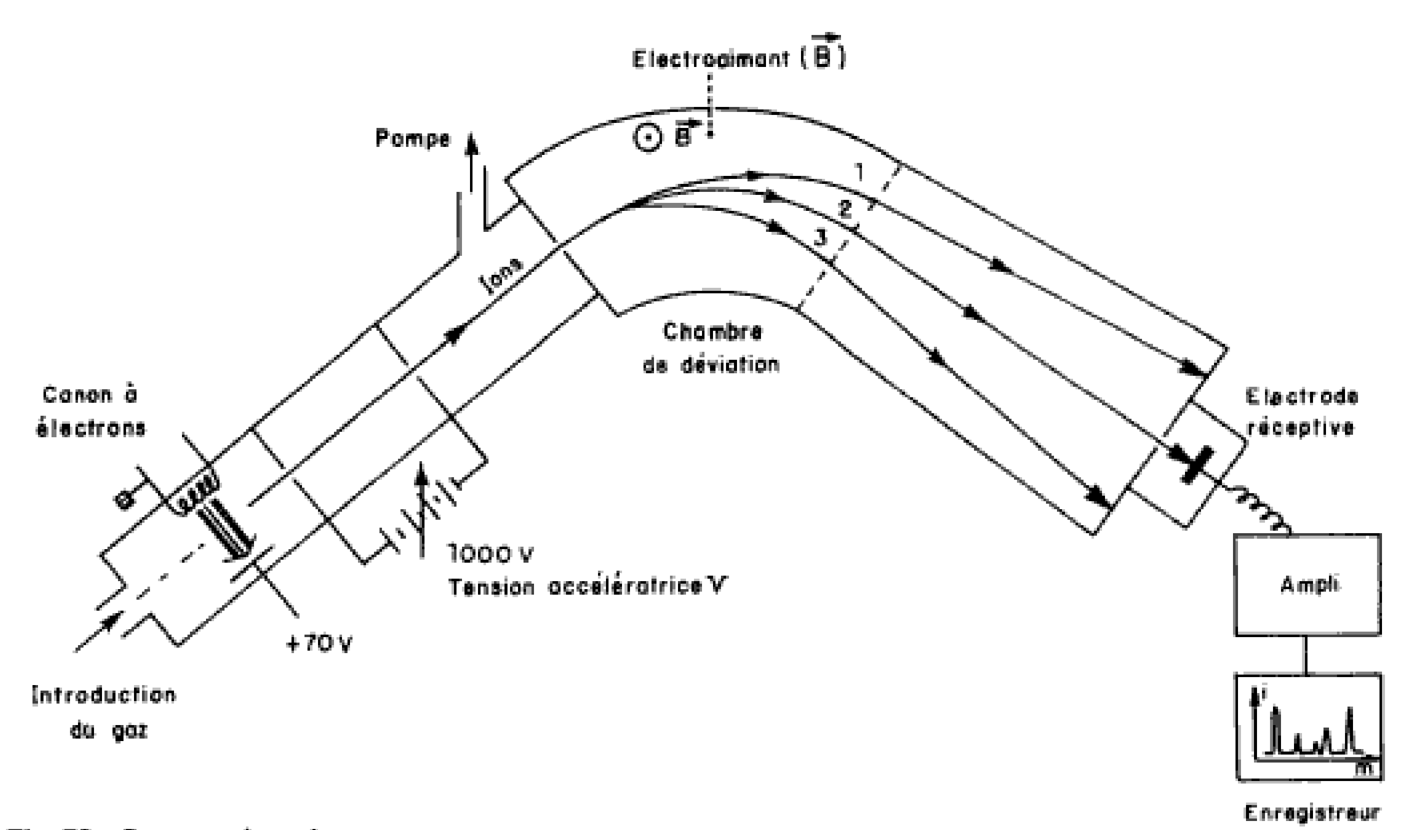


Fig. 73 Spectromètre de masse.

1.1. IONISATION DES MOLÉCULES

La substance à étudier est introduite dans la chambre d'ionisation maintenue à basse pression (10^{-4} mmHg). Les molécules, en phase gazeuse, sont alors soumises à un bombardement électronique. L'énergie des électrons étant de l'ordre de 70 eV (ils sont accélérés par une différence de potentiel de 70 V), deux phénomènes se produisent :

– arrachement d'électrons à la molécule $M \rightarrow M^{+} + e^{-}$;

– rupture de liaisons et cassure de la molécule en fragments ionisés. Ainsi, avec du méthane, aurons-nous les ions CH_4^+, CH_3^+, CH_2^+, CH^+, H^+...

Si l'on introduit des molécules complexes, le nombre d'ions peut être important ; la répartition en nombre des fragments renseigne sur leur stabilité et sur la fragilité de certaines liaisons dans la molécule.

Remarque :

Il existe d'autres méthodes d'ionisation. Dans la thermo-ionisation par exemple, la substance est vaporisée dans une enceinte où un filament de tungstène est porté à haute température. Au contact de ce filament, les molécules s'ionisent et subissent également des fragmentations produites par l'énergie thermique.

1.2. ACCÉLÉRATION DES IONS

Les ions sont alors attirés par un système d'électrodes jouant le rôle de lentilles électrostatiques : soumis à une différence de potentiel V, les ions forment un pinceau très étroit avec une vitesse v. La variation d'énergie cinétique des ions de masse m et de charge q est égale au travail des forces électrostatiques :

$$\frac{1}{2} mv^2 = qV$$

donc :

$$v = \sqrt{\frac{2qV}{m}} \qquad (1)$$

On communique ainsi aux ions de même charge la même énergie cinétique ; en revanche leur vitesse dépend de leur masse.

Certains spectromètres possèdent un filtre de vitesse ne laissant sortir de la chambre d'accélération que des ions ayant une vitesse v_0 donnée (la superposition de deux champs, magnétiques $\vec{B}$ et électrique $\vec{E}$ ne produit pas de déviation pour les ions de vitesse v_0 telle que $qv_0B = qE$; donc $v_0 = \frac{E}{B}$; la variation de E ou B permet de faire varier la vitesse v_0 recherchée).

1.3. DISPERSION DES IONS (fig. 74)

Les ions sont introduits dans une chambre de dispersion jouant le même rôle que les prismes ou réseaux dans la spectrophotométrie.

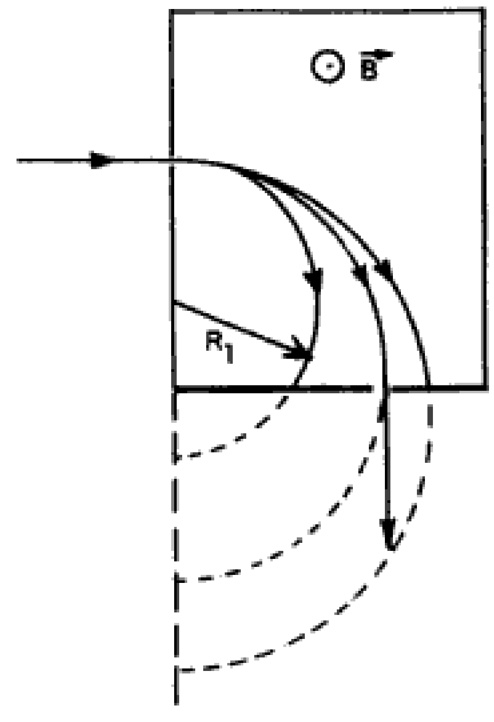


Fig. 74 Dispersion magnétique des ions.

Dans la plupart des appareils, les ions pénètrent dans l'entrefer d'un électro-aimant qui produit un champ magnétique $\vec{B}$ uniforme, perpendiculaire à la trajectoire des ions. Celle-ci devient un cercle ou une portion de cercle de rayon R. Le calcul montre que la force magnétique (qvB) est égale à la force centripète $\left(m\frac{v^2}{R}\right)$; on obtient la relation :

$$R = \frac{mv}{qB}. \quad (2)$$

Si on combine la relation (1) avec celle-ci, on obtient :

$$R^2 = \frac{m^2}{q^2B^2} \cdot v^2 = \frac{m^2}{q^2B^2} \cdot \frac{2qV}{m} = \frac{2mV}{qB^2}.$$

Seuls, vont passer dans une fente fixe les ions pour lesquels le rayon de la trajectoire est donné : R_0, donc les ions dont le rapport $\frac{m}{q}$ vérifie la relation :

$$\boxed{\frac{m}{q} = \frac{B^2 . R_0^2}{2V}}.$$

Il suffira de faire varier soit le champ magnétique B, soit le potentiel accélérateur V pour faire passer dans la fente, successivement, tous les ions du faisceau. On obtient ainsi le spectre des différents ions.

Remarque :

Il existe d'autres méthodes de dispersion et d'analyse des ions du faisceau. On peut décrire *les spectromètres à temps de vol*. Les ions sont accélérés par des impulsions (différence de potentiel brève) de tension ; ils sortent donc de la chambre d'accélération par groupes, avec des vitesses inégales (fig. 75).

Les ions mettent donc un temps plus ou moins long (selon leur vitesse) pour parcourir un canal vide, au bout duquel ils sont collectés et détectés au fur et à mesure de leur arrivée. Les temps de parcours sont reliés à leur vitesse; $v = \sqrt{\frac{2qV}{m}}$, donc à leur masse, $m = \frac{2qV}{v^2}$.

1.4. RÉCEPTEUR D'IONS

Si le faisceau d'ions est suffisant, on mesure l'intensité du courant transporté par les ions, après amplification. Le récepteur d'ions est alors un cylindre de Faraday muni d'électrodes de garde pour éviter la fuite, hors du cylindre, d'électrons produits par l'impact des ions sur le métal. Les courants d'ions, ainsi décelés, ont une intensité comprise entre 10^{-14} et 10^{-11} A.

Si la pression du gaz ionisé est insuffisante, on utilise un photomultiplicateur d'électrons, la première électrode de la cellule produisant l'émission d'électrons sous l'impact des ions reçus. Chaque impact d'ions va se traduire, à la sortie du tube, par une impulsion de courant.

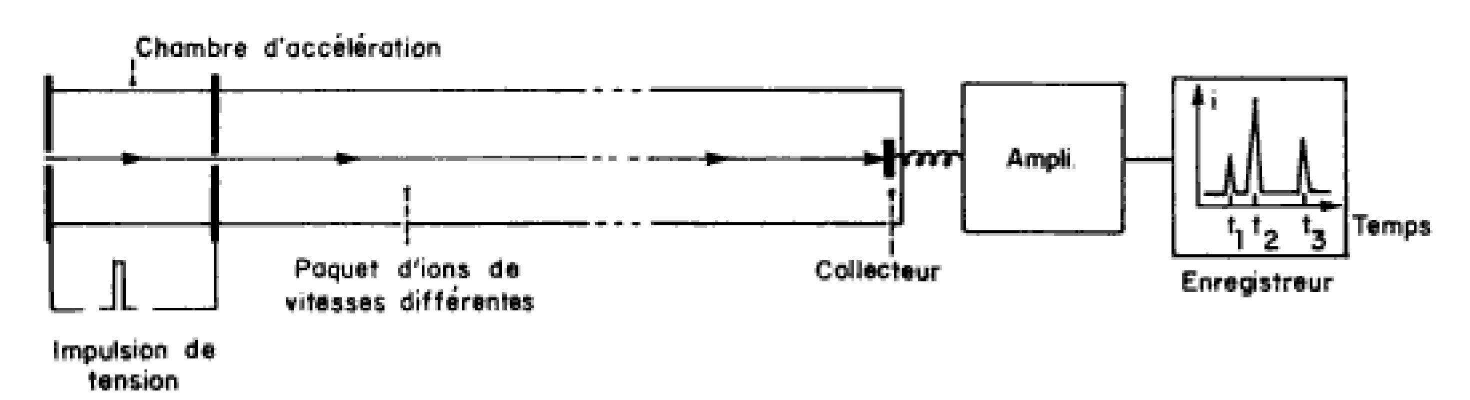


Fig. 75 Spectromètre à temps de vol.

2. Les spectres de masse

Les spectromètres de masse délivrent l'enregistrement de l'intensité du faisceau d'ions en fonction de leur masse. Le spectre de masse (fig. 76) se présente donc comme la succession de pics de hauteur différente correspondant à une masse donnée. En fait, on obtient les pics pour chaque valeur du rapport $\left(\frac{m}{q}\right)$; la plupart du temps, des ions ont une charge $q = +e$, si on règle bien l'énergie des électrons provoquant l'ionisation.

2.1. EXEMPLE DE SPECTRE
(fig. 76)

Chaque ion détecté est représenté par un trait, dont la hauteur représente l'intensité relative dans le faisceau d'ions reçus.

2.2. LE PIC MOLÉCULAIRE

La plupart du temps, un pic de forte intensité correspondant à la masse la plus élevée, représente l'ion moléculaire n'ayant pas subi de fragmentation $M \rightarrow M^+ + e^-$.

Dans le cas présent, ce pic correspond à la masse molaire de la molécule étudiée, 137 g :

Ce pic n'existe pas toujours; si la molécule possède une liaison très fragile ou un atome très labile, il pourra être absent; dans ce cas, pour l'identifier, il faudra réduire la tension des électrons ionisants.

2.3. LES PICS SATELLITES

Tous les pics correspondant aux différents fragments sont accompagnés des pics voisins (masse augmentée de une ou deux unités : M + 1, M + 2...) et d'intensité généralement plus faible. Ce phénomène est dû à la présence d'isotopes, pour chacun des atomes présents dans la molécule.

En connaissant la répartition naturelle des isotopes des différents éléments on a pu établir des tables donnant les rapports : $\frac{M}{M+1}$,

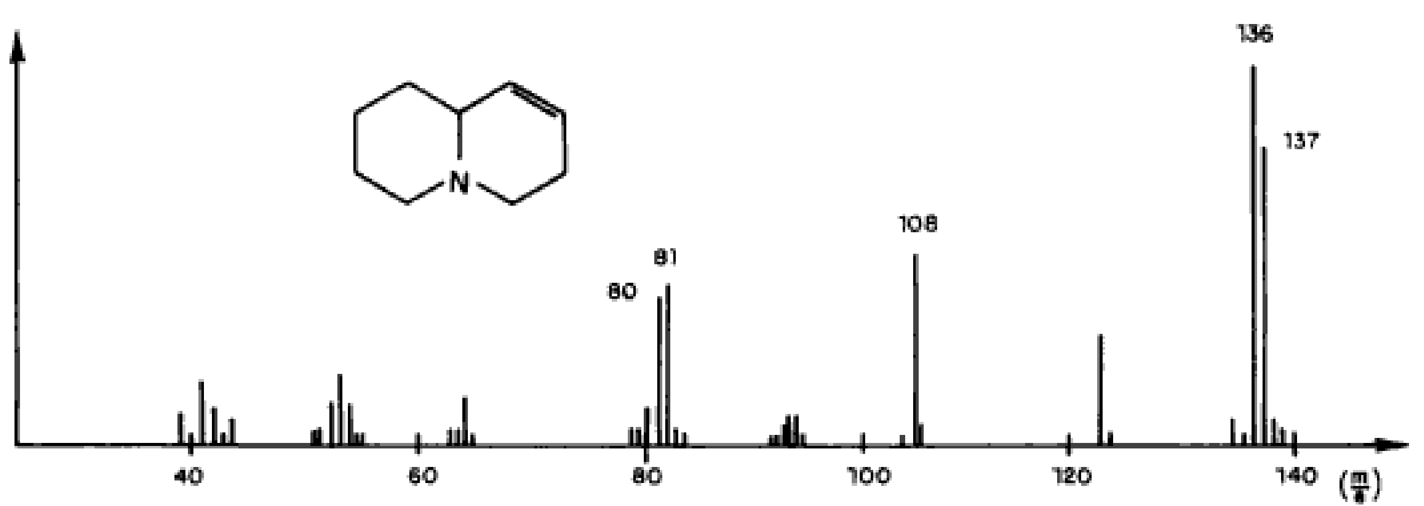


Fig. 76 Spectre de masse.

$\frac{M}{M+2} \cdots$, correspondant à différents groupements pouvant constituer des ions fréquents.

Distribution naturelle de quelques isotopes (en p. 100) :

$^{1}_{1}H$	99,984	$^{2}_{1}H$	0,016		
$^{12}_{6}C$	98,892	$^{13}_{6}C$	1,11		
$^{14}_{7}N$	99,64	$^{15}_{7}N$	0,36		
$^{16}_{8}O$	99,76	$^{17}_{8}O$	0,04	^{18}O	0,2
^{32}S	95,06	^{33}S	0,74	^{34}S	4,18

2.4. LES FRAGMENTS

Chaque pic peut être identifié et on doit interpréter la formation du fragment correspondant. Ainsi, dans notre exemple, on trouve un pic abondant à 80 et 81. On peut l'expliquer par le mécanisme suivant :

$+ \; 2 \; H_2C = CH_2$

m = 80g

+ H

H — N

m = 81g

L'étude de la fragmentation des molécules organiques simples a permis d'énoncer des lois sur la fragilité de certaines liaisons. Ces lois permettent d'interpréter les spectres de masse de molécules plus complexes.

3. Applications

On utilise la spectrographie de masse dans les principales applications suivantes :

– analyses qualitative et quantitative de mélanges gazeux, même à des pressions très faibles. Dans ce cas, un spectrographe de masse peut être utilisé comme détecteur de chromatographie en phase gazeuse ;

– détermination des masses molaires et des formules de composés organiques. L'étude des spectres renseigne alors sur les possibilités de rupture des liaisons, dans la molécule analysée ;

– analyse isotopique de gaz.

L'identification, comme l'interprétation des spectres de masse, doit utiliser les données du spectre dans son intégralité, même si, a priori, certains pics semblent peu utiles à une telle opération. La méthode d'identification la plus simple d'un spectre de masse inconnu est la comparaison directe de ce dernier avec des spectres de référence qu'on peut stocker dans une bibliothèque. Dans la pratique, le champ d'investigation est restreint, car on a d'autres renseignements sur la molécule, provenant d'autres méthodes spectrales (IR-RMN...). On utilise des systèmes de stockage et de recherche de spectres de masse par ordinateur.

II
MÉTHODES ÉLECTROCHIMIQUES

II.1. Conductimétrie

1. Définitions

Si on applique une différence de potentiel entre deux plaques d'un métal convenable, platine par exemple, immergées dans une solution d'un chlorure alcalin, on observe deux phénomènes principaux, si la différence de potentiel (ou tension) est suffisante (fig. 1) :

– il circule un courant dans l'ampèremètre ;

– il se produit des réactions chimiques aux électrodes.

On peut alors remarquer que :

– les réactions n'ont lieu qu'aux électrodes ;

– le passage du courant est instantané ; dès que la tension est appliquée, ce courant entraîne un transport de matière.

La condition, pour que le courant circule, est la présence d'ions dans la solution. Faraday proposa d'appeler *électrolytes* de telles solutions. La conduction des électrolytes diffère notablement de celle des conducteurs métalliques. Pour ces derniers, il s'agit d'un phénomène électronique et il n'est pas possible d'y mettre en évidence un transport de matière. Dans un électrolyte, le champ électrique provoque un déplacement des *ions :* les anions se dirigent vers l'anode (pôle positif) et les cations vers la cathode (pôle négatif).

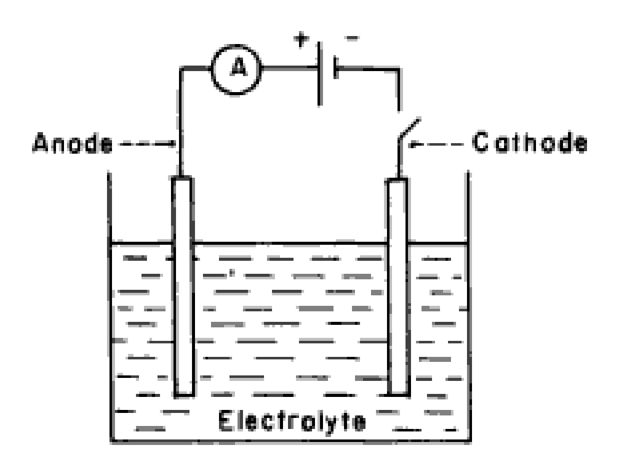


Fig. 1 Passage du courant dans un électrolyte.

On appelle *résistance de l'électrolyte* le rapport $R = \frac{V}{I}$ où V représente la tension entre les électrodes et I l'intensité du courant. Elle est exprimée en ohms (Ω). On utilise également la conductance $G = 1/R$; on l'exprime en siemens (S).

Comme pour les métaux, la conductance dépend de la surface des électrodes (S) et de leur distance (l) :

$$R = \rho \frac{l}{S} \quad \text{ou} \quad G = \gamma \frac{S}{l}$$

ρ représente la résistivité de la solution et γ sa conductivité.

Le rapport $\frac{S}{l}$ est une caractéristique d'une cellule de conductivité donnée ; on l'appelle k, la constante de la cellule $C = \gamma \, . \, k$.

Quand on veut comparer la conductance de solutions de divers électrolytes, il est d'usage de

rapporter les mesures à une mole d'équivalents. On utilise alors la conductivité équivalente, $\Lambda = \frac{\gamma}{C_e}$. En effet la quantité d'électricité qu'une espèce ionique transporte dépend de sa charge. La charge correspondant à un équivalent (un ion Na^+, un demi-ion Ba^{2+}...) est toujours la même.

• ***Cas des électrolytes forts :***

$$AxBy \rightarrow xA^{-\alpha} + yB^{+\beta}$$
$$C_e = C(\alpha x) = C(\beta y)$$

où C représente le nombre de moles dissoutes par unité de volume.

• ***Cas des électrolytes faibles :***

$$AxBy \rightleftarrows xA^{-\alpha} + yB^{+\beta}.$$

La concentration équivalente est toujours :

$$C_e = C(x\alpha) = C(y\beta).$$

Elle représente le nombre de moles de charges de chaque signe que l'électrolyte libérerait par unité de volume, si c'était un électrolyte fort. Donc, à l'équilibre, on peut utiliser le coefficient de dissociation δ :

$$[A^{-\alpha}] = x\delta . C \,, \qquad [\beta^{+\beta}] = y\delta . C$$

donc :

$$[A^{-\alpha}] = \delta . \frac{C_e}{\alpha} \qquad \text{ou} \qquad [B^{+\beta}] = \delta . \frac{C_e}{\beta}.$$

2. Mobilité des ions

2.1. DÉFINITION

Lorsqu'un ion de charge q est soumis à un champ électrique, une force agit sur lui et lui communique une vitesse v ; il est alors soumis à des forces de frottement. Si on assimile l'ion à une sphère de rayon r, la force de frottement est donnée par la loi de Stokes, dans laquelle η représente le coefficient de viscosité de la solution :

$$f_v = 6\pi\eta r v.$$

La force électrique dépend de la tension V entre les électrodes et de leur distance l :

$$F = q\frac{V}{l} = qE \quad \text{(champ électrique.)}$$

La relation fondamentale de la dynamique appliquée à l'ion donne donc :

$$m\Gamma = m\frac{dv}{dt} = qE - 6\pi\eta r v.$$

L'intégration montre que v tend rapidement vers une valeur limite v_l où son accélération Γ est nulle :

$$0 = qE - 6\pi\eta r v_l \qquad \text{donc} \qquad v_l = \frac{q}{6\pi\eta r}E = kE.$$

En pratique, on considère que la vitesse limite est atteinte instantanément ; on l'appelle tout simplement la *vitesse de l'ion*. Elle est proportionnelle au champ électrique E ; le coefficient k représente la mobilité de l'ion :

$$k = \frac{v}{E};$$

elle dépend de la solution par le coefficient de viscosité η.

2.2. RELATION ENTRE MOBILITÉ ET CONDUCTIVITÉ ÉQUIVALENTE (RELATION DE KOHLRAUSCH)

Soit $AxBy$ la formule d'un électrolyte en équilibre avec des ions $A^{-\alpha}$ et $B^{+\beta}$:

$$AxBy \rightleftarrows xA^{-\alpha} + yB^{+\beta}.$$

Si c représente la concentration molaire volumique de la substance, δ son coefficient de dissociation, on a les égalités (fig. 2) :

$$[A^{-\alpha}] = xc\delta; \qquad [B^{+\beta}] = yc\delta$$

On utilise la concentration équivalente :

$$C_e = xc\alpha = yc\beta.$$

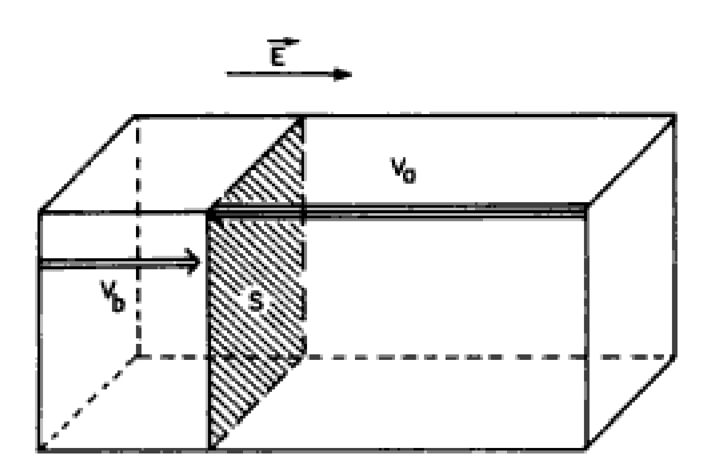


Fig. 2 Déplacement des ions dans un électrolyte.

Pour calculer la quantité d'électricité qui traverse une surface S, parallèle aux électrodes, par unité de temps, il faut considérer les cations $B^{+\beta}$, qui transportent des charges dans le sens de $\vec{E}$ et les anions $A^{-\alpha}$, qui transportent des charges négatives en sens inverse. Leurs effets s'ajoutent. Pendant l'unité de temps, tous les ions qui traversent la surface S sont localisés dans un volume parallélépipédique de section S et de hauteur, respectivement v_a et v_b pour les ions $A^{-\alpha}$ et $B^{+\beta}$.

La quantité d'électricité correspondante, c'est-à-dire l'intensité du courant, est donc :

$$I = Ib + Ia = F[B^{+\beta}].\beta.Sv_0 + F.[A^{-\alpha}].\alpha.Sv_a$$
$$= FSE(k_a.xc\alpha\delta + k_b yc\beta.\delta)$$

On en déduit la résistance R et la conductivité $\gamma = \frac{1}{R}\frac{l}{S}$

$$\gamma = cx\delta.\alpha.Fk_a + cy\delta.\beta.Fk_a.$$

La conductivité d'une solution apparaît comme la somme de deux termes caractéristiques de chaque ion; ce qui peut s'écrire

$$\gamma = \sum_i c_i z_i \lambda_i$$

avec λ_i conductivité équivalente de l'ion i,
z_i nombre de charge de l'ion i.

La conductivité équivalente de l'électrolyte est alors :

$$\Lambda = \frac{\gamma}{C_e} = F.\delta.(k_a + k_b).$$

F représente le faraday (96 500 C), k_a et k_b les mobilités de l'anion et du cation, respectivement.

2.3. CONDUCTIVITÉ ÉQUIVALENTE LIMITE

Lorsqu'on dilue une solution d'électrolyte faible, c'est-à-dire que l'on fait tendre sa concentration vers zéro, le coefficient de dissociation δ tend vers un, et, quel que soit l'électrolyte, la conductivité tend vers zéro ; la conductivité équivalente $\left(\Lambda = \frac{\gamma \to 0}{C_e \to 0}\right)$ tend vers une limite que l'on peut obtenir par extrapolation de la courbe $\Lambda = f(C_e)$ lorsque C_e tend vers zéro.

2.3.1. IMPORTANCE DE Λ_0

A dilution infinie les interactions entre les ions deviennent nulles ; les mobilités des ions ne dépendent alors que de leur grosseur et de leur charge, puisque la viscosité devient un facteur constant ; ces mobilités tendent donc vers une valeur limite caractéristique de chaque ion.

Si $C_e \to 0$:

$$\Lambda \to \Lambda_0 = F(k_{a_0} + k_{b_0}) = \lambda_{a_0} + \lambda_{b_0}$$

La conductivité équivalente limite peut être considérée comme la somme de deux termes qu'on appelle *conductivité équivalente de chaque ion en présence.*

2.3.2. MESURE DE Λ_0

• ***Cas des électrolytes forts :***

Pour les faibles concentrations, on peut montrer que :

$$\Lambda = \Lambda_0 - A\sqrt{C_e}$$

où A est une constante qui ne dépend que de la nature du solvant.

Cette relation permet donc d'obtenir la conductivité équivalente limite par extrapolation de la courbe obtenue en mesurant la conductivité équivalente à différentes concentrations (fig. 3).

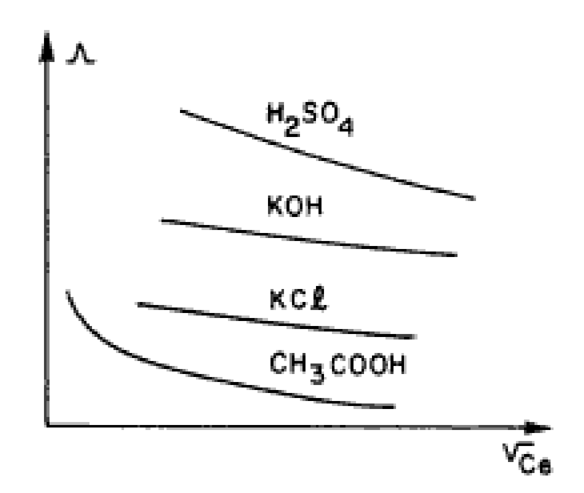


Fig. 3 Influence de la concentration sur Λ.

et le calcul de Λ_0 permettent de déterminer le coefficient de dissociation δ.

2.3.3.2. Détermination des mobilités limites

La méthode des « nombres de transport », qu'on ne développera pas ici, donne une deuxième relation entre les mobilités d'un électrolyte. On peut donc mesurer :

– d'une part le rapport :

$$t_a = \frac{k_a^0}{k_a^0 + k_b^0};$$

– d'autre part la somme :

$$\Lambda_0 = F(k_a^0 + k_b^0).$$

La résolution de ce système permet d'obtenir les *mobilités limites* de tous les ions. Le tableau suivant en donne quelques valeurs :

Ions	H^+	Li^+	Ba^{2+}	OH^-	CH_3COO^-
Mobilités limites (k_a^0 ou k_b^0) (10^{-8} SI)	34	3,8	7,3	20,0	3,8
Conductivités équivalentes limites (10^{-3} SI)	32,8	3,7	6,9	19,3	3,7

• ***Cas des électrolytes faibles :***

La courbe $\Lambda = f(\sqrt{C_e})$ n'est plus une droite. L'extrapolation devient très imprécise (exemple CH_3COOH). On préfère calculer Λ_0 à partir d'électrolytes forts.

Exemple :

$$\Lambda_0(CH_3COOH) = \Lambda_0(CH_3COO^-, Na^+) + \Lambda_0(H^+Cl^-) - \Lambda_0(Na^+Cl^-).$$

2.3.3. APPLICATIONS DE LA MESURE DE Λ_0

2.3.3.1. Détermination du coefficient δ

Dans le cas des électrolytes faibles, aux faibles concentrations, $\Lambda \simeq \delta\Lambda_0$; donc la mesure de Λ

2.3.3.3. Facteurs dont dépend la conductivité équivalente limite d'un ion

• ***La température***

Une élévation de température entraîne toujours une augmentation de la mobilité électrique. Ce fait est relié à la variation de la viscosité du milieu, qui diminue toujours lorsque la température croît. On peut montrer que le produit $\lambda_0\eta$ reste constant, pour un ion donné, lorsque la température varie.

• ***La viscosité du solvant***

Si le sel est dissous dans un solvant non aqueux, on peut montrer que le produit $\lambda_0\eta$ reste toujours le même; la loi de Stokes est donc toujours bien vérifiée.

3. Applications analytiques : conductimétrie

La conductance d'une solution dépend, d'une part, de la concentration et, d'autre part, de la nature des différents ions en présence. On peut donc envisager cette méthode pour analyser une solution.

3.1. MESURE DE CONDUCTANCE (OU DE RÉSISTANCE)

On mesure la conductance de la portion de liquide comprise entre les électrodes d'une cellule de conductivité :

– soit par une méthode dérivée de celle du pont de Wheatstone ; la détermination demande alors l'équilibrage d'un pont de résistance,

– soit par une méthode à lecture directe.

3.1.1. LA CELLULE DE CONDUCTIVITÉ

Elle est constituée d'un corps en verre portant deux plaques de platine platiné. Elle est munie d'une tête isolante en résine acrylique et d'un cordon de branchement blindé (fig. 4).

Les cellules doivent, en dehors des périodes d'utilisation, être conservées en permanence dans de l'eau distillée que l'on prendra soin de renouveler fréquemment pour éviter le développement d'algues qui ont tendance à s'inscruter dans les pores de la couche de noir de platine dont elles diminuent la surface active. Lorsque les cellules sont stockées à sec, la couche de noir de platine se déshydrate rapidement, ce qui se traduit par une diminution de la constante. En général, une simple immersion dans l'eau distillée n'est pas suffisante, et il faut alors avoir recours à une « activation », par électrolyse d'une solution d'acide sulfurique à 5 p. 100. Certains conductimètres à lecture directe comportent un circuit d'électrolyse prévu à cet usage.

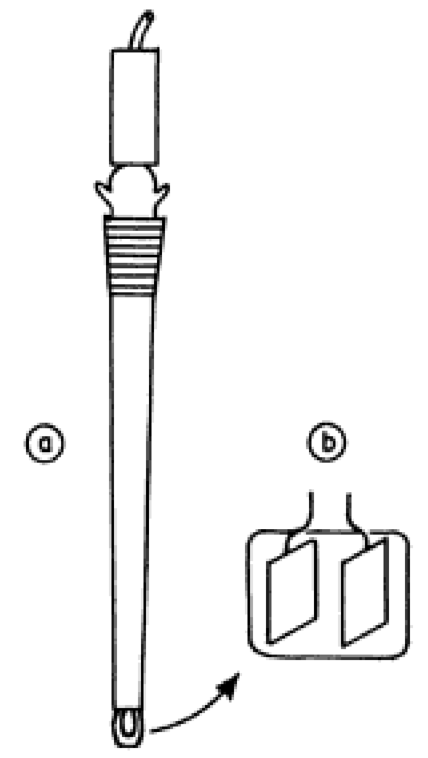


Fig. 4 Cellule de conductivité.

3.1.2. CONDUCTIMÈTRES A LECTURE DIRECTE

Une source de tension alternative stabilisée alimente un diviseur potentiométrique constitué par une résistance étalon **R** et la cellule de mesure, montées en série. La valeur de **R** est réglable au moyen du commutateur de gammes (fig. 5).

La tension, aux bornes de la cellule, varie avec

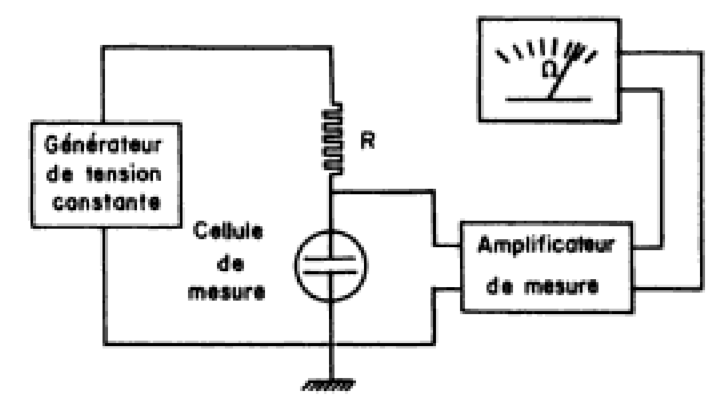


Fig. 5 Conductimètre.

le rapport de la résistance de la cellule à la résistance étalon prise comme référence. Cette tension est mesurée et amplifiée. Un instrument indicateur est connecté à la sortie de l'amplificateur.

Les phénomènes de polarisation des électrodes sont rendus négligeables d'une part par l'utilisation d'un signal alternatif de fréquence convenable (cf. II.1, 3.1.3), d'autre part en limitant la tension aux bornes de la cellule à 250 mV environ.

3.1.3. PONT DE MESURE

Il est souvent nécessaire d'effectuer des mesures de conductance de grande précision. Pour cela il faut inclure la cellule de mesure dans un pont de Wheatstone alimenté par un signal alternatif et détecter son équilibre, à la fois en amplitude et en phase (fig. 6*a*).

En courant alternatif, les électrodes se chargent et se déchargent avec une certaine inertie, qui va se traduire par l'apparition d'un déphasage entre la tension et l'intensité. Le dipôle équivalent à une cellule conductimétrique peut être considéré comme un condensateur (capacité C) en série avec la résistance (R) (fig. 6*b*). Pour diminuer le déphasage entre l'intensité et la tension, il faut diminuer la tension aux bornes du condensateur ; $\left(\frac{I}{C\omega} = \frac{I}{C2\pi f}\right)$ il suffit pour cela d'augmenter la fréquence.

On peut donner quelques ordres de fréquences à utiliser en fonction de la résistance de la cellule.

γ ($\mu.S.m^{-1}$)	$< 10^3$	10^3 à 10^6	$> 10^6$
f (Hz)	50	10^3	10^4

L'organe détecteur est soit un écouteur téléphonique, soit un amplificateur électronique. La tension, amplifiée est alors appliquée :

– à un indicateur cathodique dont le trèfle s'ouvre ou se referme lorsqu'on passe par l'équilibre ;

– à un oscillographe ;

– à un servomoteur déplaçant le curseur du potentiomètre d'équilibrage ; la position de ce curseur donne directement la conductivité et permet l'enregistrement.

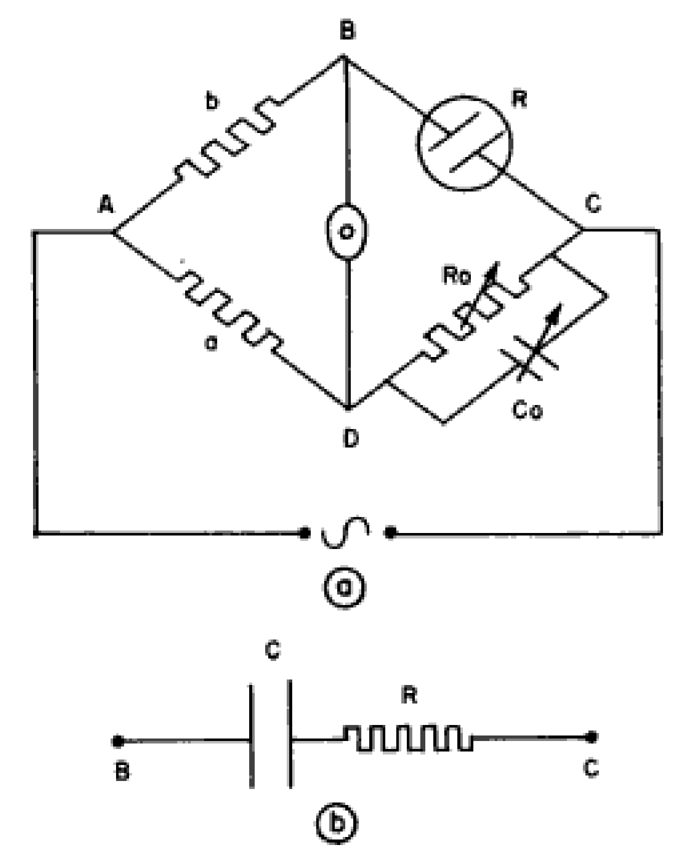


Fig. 6 *a*) Pont de mesure. *b*) Dipôle équivalent à une cellule de conductivité.

3.2. APPLICATIONS ANALYTIQUES

3.2.1. CONDUCTIMÉTRIE DIRECTE

Cette méthode peut être utilisée pour des solutions diluées (même si elles sont troubles ou colorées) où l'on peut considérer que la conductivité, γ, est proportionnelle à la concentration, C_e :

$$\gamma = \frac{1}{Rk} = \Lambda . C_e$$

Λ représente la conductivité équivalente (cf. II.1, 1).

La mesure de conductivité nécessite la détermination au préalable de la constante de la cellule k. La proportionalité entre la conductivité γ et la concentration C_e n'est réalisée qu'en solution diluée où la conductivité équivalente est voisine de la conductivité équivalente limite Λ_0 (donc constante). En solutions diluées :

$$\gamma = \Lambda_0 . C_e .$$

On peut citer les exemples d'applications suivants :

– *contrôle de pureté :* dans la déminéralisation et la désionisation de l'eau, la mesure de conductivité permet de contrôler et d'analyser les eaux courantes, les eaux de chaudières, les eaux permutées, usées, minérales, etc. Elle permet de déterminer le taux de salinité de l'eau de mer ;

– *détermination des constantes d'équilibres :* constantes d'acidité, produits de solubilité, etc. ;

– *analyse de gaz :* on absorbe les substances ionisables dans des solvants appropriés et on mesure la variation de conductivité ;

– *détermination du point isoélectrique des acides aminés :* la variation de γ en fonction du pH passe par un minimum en ce point ;

– *étude de cinétique :* souvent, au cours d'une réaction, il se forme des produits dont la conductivité équivalente est différente de celle des réactifs ;

– *dosage de certaines substances moléculaires :* il suffit que ces substances puissent être hydrolysées, par exemple, pour former des électrolytes, comme dans le dosage de l'urée.

• ***Microdosage de l'urée sanguine*** (d'après le P^R^ Dumontier) :

On enregistre la variation de conductivité qui accompagne l'hydrolyse de l'urée par l'uréase. La réaction globale s'écrit :

$$O=C\begin{smallmatrix} NH_2 \\ NH_2 \end{smallmatrix} + H_2O \rightarrow CO_2 + 2\,NH_3 \rightleftharpoons 2\,NH_4^+$$
$$CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- \rightleftharpoons CO_3^{2-}$$

Selon le pH du milieu H_2CO_3 sera plus ou moins ionisé, de même que NH_3.

Pour un pH *donné, la variation de conductivité,* produite par l'hydrolyse, sera proportionnelle à la concentration *initiale* en urée. Il suffira donc de réaliser une mesure avec une solution étalonnée d'urée.

Exemple d'étude :

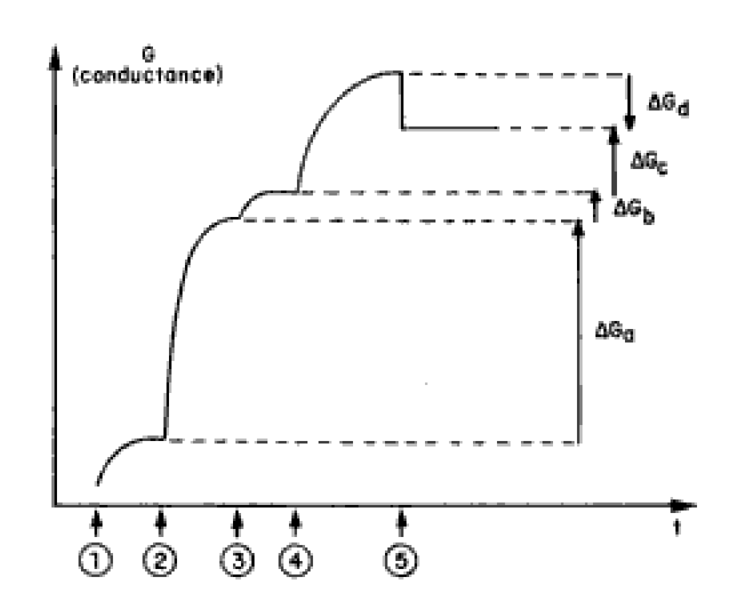


Fig. 7 Dosage conductimétrique de l'urée.

1 : remplissage de la cellule avec tampon + plasma ou sérum à doser ; l'équilibre thermique se traduit par un palier.

2 : première introduction d'uréase (200 µl) : réaction d'hydrolyse.

3 : deuxième introduction d'uréase (200 µl) : variation de conductivité due à l'uréase et à la dilution. Donc la variation de conductivité due à la réaction sera : $\Delta G_1 = \Delta G_a - \Delta G_b$ (expression algébrique : ici ΔG_a et ΔG_b sont positifs).

4 : *étalonnage :* introduction de 20 µl de solution d'urée de concentration voisine.

5 : introduction de 20 µl d'eau distillée pour corriger l'influence de la dilution : $\Delta G_0 = \Delta G_c - \Delta G_d$ (algébriquement, ΔG_c est positif, alors que ΔG_d est négatif).

Soit ΔG_1 et $\Delta\gamma_1$ les variations de conductance et de conductivité produites par l'hydrolyse d'une solution d'urée de concentration incon-

nue, ΔG_0 rt $\Delta\gamma_0$ les mêmes grandeurs produites par une solution d'urée de concentration donnée :

$$\frac{\text{concentration en urée inconnue}}{\text{concentration en urée étalon}} = \frac{\Delta\gamma_1}{\Delta\gamma_0} = \frac{\Delta G_1}{\Delta G_0}.$$

3.2.2. DOSAGES CONDUCTIMÉTRIQUES

La mesure de conductance peut être utilisée pour déterminer le point d'équivalence d'un dosage lorsque l'allure de diagramme, conductance-volume de réactif, diffère nettement avant ou après le point d'équivalence (V_e).

La condition pour observer une variation de conductance est la suivante : les espèces chimiques ajoutées ou formées doivent avoir une *mobilité* différente ou le nombre des ions doit varier. Nous raisonnerons en considérant les conductivités équivalentes λ, proportionnelles aux mobilités ($\lambda = F.k$).

Les courbes de dosage peuvent présenter des allures différentes, mais au-delà du point d'équivalence la branche du graphe est toujours ascendante ; en effet, le réactif utilisé est en général un électrolyte fort donc l'addition entraîne une augmentation de conductance de la solution.

Pour éliminer l'influence de la *dilution* on calcule la conductance corrigée G'. Si V_0 est le volume initial de la solution, V le volume de réactif ajouté, en ne tenant compte que de la dilution, donc en considérant l'électrolyte n'ayant pas réagi, de conductivité équivalente λ et dont le nombre d'équivalent est n :

$\gamma = \lambda.C = \lambda \dfrac{n}{V_0 + V}$ représente la conductivité mesurée,

$\gamma' = \lambda.C' = \lambda \dfrac{n}{V_0}$ représenterait sa conductivité *corrigée*, s'il n'y avait pas de dilution.

$$\frac{\gamma'}{\gamma} = \frac{\lambda n}{V_0} \cdot \frac{V_0 + V}{\lambda n} = \frac{V_0 + V}{V_0}.$$

Donc la conductance corrigée G' sera :

$$G' = G\,\frac{V_0 + V}{V_0}.$$

Les courbes représentant les variations de G' en fonction de V seront alors des *segments de droites* au lieu d'être des exponentielles. Nous allons examiner quelques exemples.

3.2.2.1. Dosage d'un acide fort par une base forte (fig. 8)

Soit la réaction :

H^+Cl^-	+ Na^+OH^+ →	H_2O	+ Na^+Cl^-
solution initiale	réactif ajouté	non conductrice	solution finale

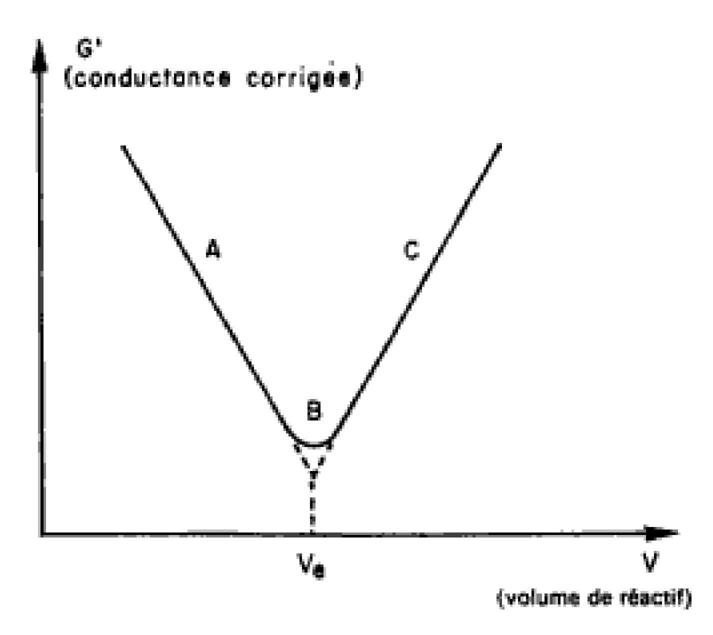


Fig. 8 Dosage conductimétrique d'un acide fort par une base forte.

$V < V_e$:

Toute la soude ajoutée a disparu. Si on compare la solution finale et la solution initiale, on voit que l'on a remplacé des ions H^+ par des ions Na^+. Il suffit de comparer leurs conductivités équivalentes :

$$\lambda_0(H^+) = 35.10^{-3}\ \text{SI}$$
$$\lambda_0(Na^+) = 5.10^{-3}\ \text{SI.}$$

La conductivité des ions Na^+ étant inférieure à celle des ions H^+, la conductance de la solution diminue (branche A).

$V > V_e$:

Après le point d'équivalence il n'y a plus de réaction chimique mais la soude ajoutée introduit des ions Na^+ ($\lambda = 5.10^{-3}$ SI) et des ions OH^- ($\lambda = 20.10^{-3}$ SI). La conductivité augmente (branche C).

Remarque :

Il n'est pas nécessaire de faire beaucoup de mesures au voisinage du point d'équivalence (branche B) car on obtient facilement ce point par extrapolation des branches C et A.

3.2.2.2. Dosage d'un acide faible par une base forte (fig. 9)

Soit la réaction :

$$\underbrace{CH_3COOH}_{\text{solution initiale}} + \underbrace{Na^+OH^-}_{\text{réactif ajouté}} \rightleftarrows \underbrace{CH_3COO^-Na^+ + H_2O}_{\text{solution finale}}$$

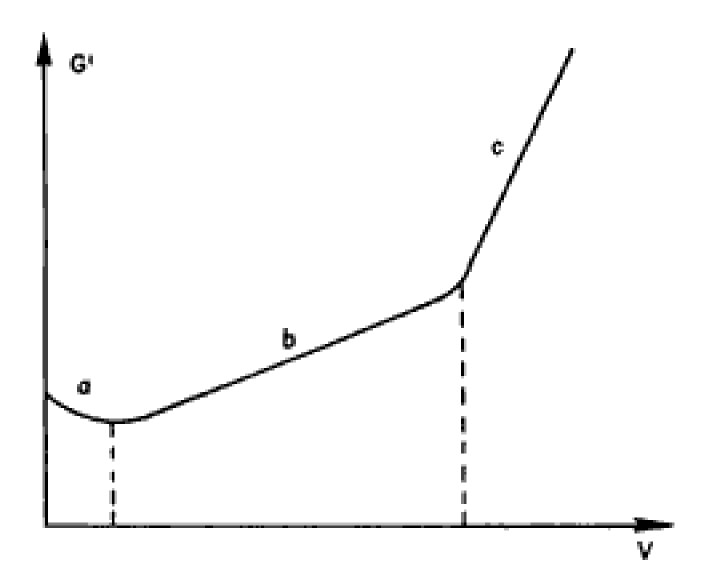


Fig. 9 Dosage conductimétrique du CH_3COOH par NaOH.

La différence avec le dosage précédent vient du fait que l'électrolyte initial est faible (l'acide est partiellement dissocié). Il faut introduire ici la constante d'acidité du couple acido-basique :

$$K_a = \frac{[CH_3COO^-][H^+]}{[CH_3COOH]}.$$

Si on appelle C_0 la concentration molaire volumique initiale de l'acide et x la concentration molaire en soude introduite, pour $V < V_e$, on peut écrire :

$$[CH_3COOH] \simeq C_0 - x; \quad [CH_3COO^-] \simeq x;$$
$$[H^+] \simeq Ka\frac{C_0 - x}{x}$$

(on peut en effet considérer que la réaction est pratiquement totale). La conductivité sera alors :

$$\gamma = \sum_i C_i\lambda_i = \lambda_{H^+}.Ka\frac{C_0 - x}{x} + \lambda_{CH_3COO^-}.x + \lambda_{Na^+}.x.$$

L'étude de la variation de $\gamma = f(x)$ montre alors que la conductivité passe par un minimum pour :

$$x = \sqrt{\frac{\lambda_{H^+}.Ka.C_0}{\lambda_{CH_3COO^-} + \lambda_{Na^+}}}.$$

Après ce minimum on peut négliger (H^+) devant (Na^+) et on obtient une augmentation linéaire de la conductivité, jusqu'au point d'équivalence.

$$\gamma \simeq (\lambda_{CH_3COO^-} + \lambda_{Na^+}).x.$$

Après le point d'équivalence la conductivité croît plus rapidement car les ions OH^- ont une conductivité équivalente supérieure à celle des ions acétate.

$(\lambda_{0(CH_3COO^-)} = 4.10^{-3}$ SI ;
$\lambda_0(OH^-) = 20.10^{-3}$ SI).

3.2.2.3. Dosage conductimétrique par précipitation (fig. 10)

On peut utiliser la réaction :

$$\underbrace{Ag^+, NO_3^-}_{\text{solution initiale}} + \underbrace{Na^+, Cl^-}_{\text{réactif ajouté}} \rightarrow AgCl \downarrow + \underbrace{Na^+, NO_3^-}_{\text{solution finale}}$$

Avant le point équivalent, le réactif ajouté disparaît complètement. La réaction consiste donc à remplacer des ions Ag^+ ($\lambda = 0{,}54 . 10^{-2}$ SI) par des ions Na^+ ($\lambda = 0{,}50 . 10^{-2}$ SI). La conductivité décroît donc légèrement.

Après l'équivalence, le chlorure de sodium, en excès, produit une augmentation rapide de conductivité. La solubilité réelle du produit est un facteur fondamental du dosage ; elle se traduit par la partie arrondie de la courbe au voisinage du point d'équivalence. Le dosage d'un électrolyte monovalent en solution 0,1 mol.dm^{-3} exige que la solubilité du produit n'excède pas $5 . 10^{-3}$ mol.dm^{-3}. Il faut de plus que le précipité se dépose rapidement et qu'il n'adsorbe pas trop les ions de la solution.

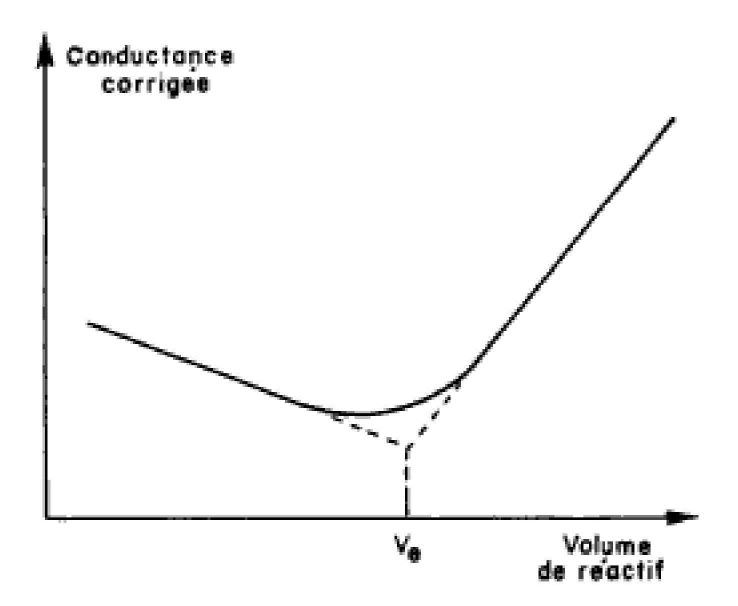


Fig. 10 Dosage conductimétrique de Cl^- par Ag^+.

3.2.2.4. Dosage conductimétrique d'un mélange (fig. 11)

Considérons le mélange : chlorure d'ammonium et acide chlorhydrique. On peut le doser par une solution de soude.

Avant le premier point d'équivalence, l'acide fort réagit :

$$\underbrace{H^+Cl^-}_{\text{solution initiale}} + \underbrace{Na^+OH^-}_{\text{réactif ajouté}} \rightarrow H_2O + \underbrace{Na^+Cl^-}_{\text{solution finale}} .$$

On remplace donc les ions H^+ par des ions Na^+ moins mobiles : γ diminue.

Entre les deux points d'équivalence, l'acide faible (NH_4^+) réagit :

$$\underbrace{NH_4^+, Cl^-}_{\text{solution initiale}} + \underbrace{Na^+OH^-}_{\text{réactif ajouté}} \rightarrow NH_3 + H_2O + \underbrace{Na^+Cl^-}_{\text{solution finale}} .$$

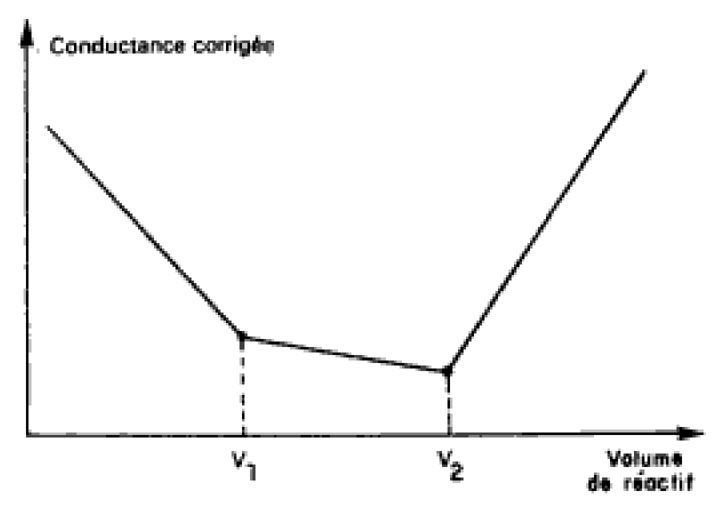


Fig. 11 Dosage conductimétrique d'un mélange NH_4^+ et H^+ par NaOH.

On remplace donc des ions NH_4^+ ($\lambda = 0{,}76 . 10^{-2}$ SI) par des ions Na^+ ($\lambda = 0{,}5 . 10^{-2}$ SI). La conductivité décroît plus lentement.

L'*excès de soude* produit enfin une augmentation rapide de la conductivité.

II.2. Polarographie. Ampérométrie. Potentiométrie à intensité faible

On se propose d'étudier dans ce chapitre l'influence du potentiel d'électrode sur la *vitesse* d'une réaction d'oxydo-réduction et quelques applications.

Une réaction d'oxydo-réduction étant un échange d'électrons, le nombre d'électrons échangés par unité de temps représente la vitesse de la réaction. Donc, pour une réaction d'oxydation ou de réduction se produisant à une électrode, la *vitesse* de réaction peut être mesurée par l'*intensité du courant* qui traverse cette électrode.

1. Graphes : intensité de courant-potentiel

1.1. COUPLE RÉDOX EN ÉQUILIBRE

Considérons une électrode métallique (platine, par exemple) au contact d'une solution comportant un couple oxydo-réducteur. On appellera Réd la forme réduite de ce couple et Ox l'oxydant. L'équation d'oxydo-réduction est la suivante :

$$\text{Réd} \underset{v_2}{\overset{v_1}{\rightleftharpoons}} \text{Ox} + ne^-.$$

Nous avons déjà vu (Tome 1, chapitre IV, IV.1) que l'équilibre de ce système est obtenu lorsque les vitesses de la réaction, dans les deux sens, sont égales.

La réaction d'oxydation s'effectue avec la vitesse v_1. L'électrode joue alors le rôle d'anode : une réaction anodique est une oxydation.

La réaction de réduction s'effectue avec la vitesse v_2. L'électrode joue alors le rôle de cathode.

A la réaction anodique correspond un courant qu'on notera $i_{(+)}$, tandis qu'à la réaction cathodique correspond un courant $i_{(-)}$. Par convention les courants anodiques sont comptés positivement.

A l'équilibre, l'électrode se trouve au potentiel E_0 du couple rédox dans les conditions considérées. Alors $i_{(+)}$ et $i_{(-)}$ ont les valeurs particulières $i_{(+)_0}$ et $i_{(-)_0}$. Le courant résultant étant nul, $i_{(+)_0} = -(i_{(-)_0})$.

1.2. COUPLE RÉDOX PORTÉ A UN POTENTIEL E ≠ E_0

1.2.1. MONTAGE EXPÉRIMENTAL (fig. 12)

G est un générateur de tension muni d'un inverseur de polarité (non représenté dans la

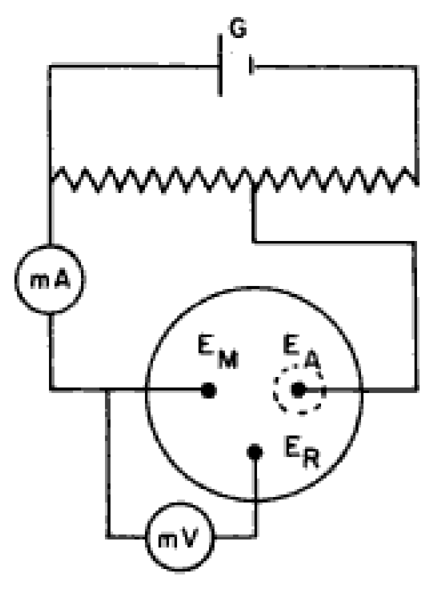


Fig. 12 Montage pour le tracé d'un graphe intensité-potentiel.

figure) et d'un montage potentiométrique. E_M est l'électrode étudiée ou électrode de mesure. E_R est une électrode de référence, en général une électrode au calomel saturé (ECS). E_A est une contre-électrode qui permet au courant de circuler dans le circuit extérieur. Si la réaction de contre-électrode est gênante on peut placer un verre poreux pour protéger la solution.

On étudie la variation de l'intensité en fonction du potentiel de l'électrode d'étude (E).

1.2.2. GRAPHES (fig. 13)

On obtient essentiellement deux types de graphes :

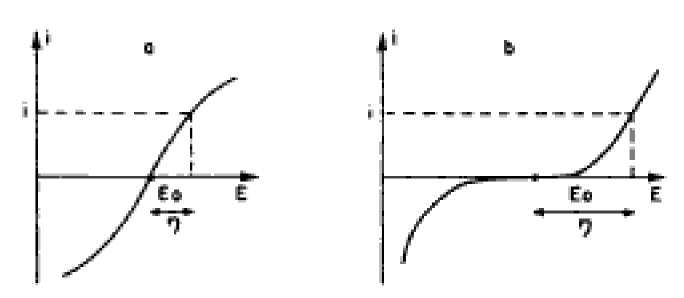


Fig. 13 Graphes intensité-potentiel. *a*) Système rapide. *b*) Système lent.

On constate, dans la figure 13*a*, que si l'on impose au couple un potentiel E légèrement différent de E_0 (potentiel d'équilibre), on obtient un courant appréciable. Ce même courant est obtenu, dans la figure 13*b*, pour un potentiel très différent de E_0. On dit que le premier système est rapide ou réversible ; alors que le second système est lent ou irréversible. Le caractère lent ou rapide dépend de nombreux facteurs et essentiellement de la nature de l'électrode métallique où a lieu l'échange d'électrons. La différence entre le potentiel de la solution pour un courant *i* et le potentiel d'équilibre est appelé *surtension* (η).

On peut montrer, en étudiant les graphes avec *l'oxydant seul* ou le réducteur seul, que la courbe obtenue avec le *couple* rapide est la somme algébrique des deux premières (fig. 14).

Dans le cas du système lent, les courbes sont les mêmes.

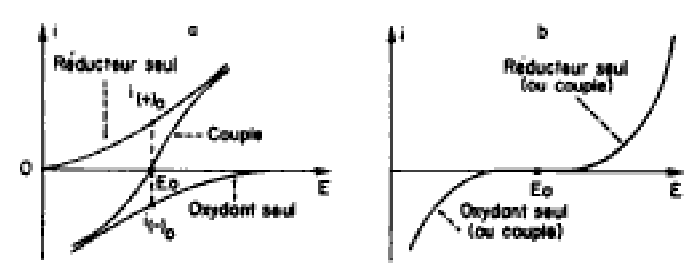


Fig. 14 Graphes intensité-potentiel. *a*) Couple rapide. *b*) Couple lent.

1.2.3. COURANT LIMITE DE DIFFUSION

Les graphes de polarisation (fig. 15) prennent une allure particulière lorsque l'étude est réalisée en présence d'un électrolyte indifférent (non oxydable ou réductible dans les conditions opératoires) en concentration importante (cent fois plus concentré que la substance active). On peut étudier l'oxydation d'un réducteur, seule substance active en solution. Lorsqu'on augmente progressivement le potentiel de l'électrode, on observe d'abord une intensité très faible appelée *intensité résiduelle*, i_R, puis, brusquement l'intensité augmente proportionnellement au potentiel pour se stabiliser enfin (palier d'intensité, i_D). On peut résumer ainsi les phénomènes qui se produisent :

– *l'électrolyte indifférent* est formé d'ions qui vont être déplacés par le champ électrique existant dans la solution ; cette accumulation de charges au voisinage de chaque électrode,

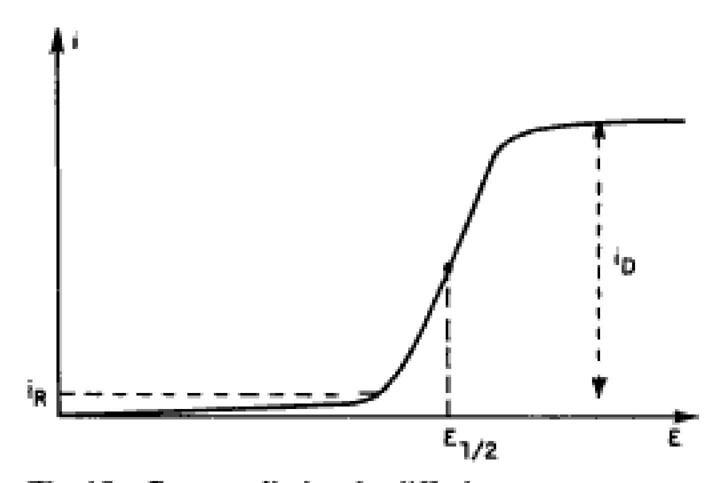


Fig. 15 Courant limite de diffusion.

constitue une couche d'électricité qui annule le champ électrique de la solution. Mais l'agitation thermique tend à disperser les charges de cette couche, qui doit donc constamment être renouvelée. Ce phénomène donne naissance à un courant permanent, mais faible, le *courant résiduel*.

Lorsque le potentiel de l'électrode de mesure est suffisant, il se produit une réaction sur cette électrode ; dans le cas présent :

$$\text{Réd} \rightarrow \text{Ox} + ne^-.$$

Le nombre d'électrons échangés (donc le courant) augmente avec le potentiel. C'est la partie ascendante du graphe. La concentration en espèce active (réducteur) diminuant au voisinage de l'électrode, il se crée un gradient de concentration qui provoque la diffusion de cette substance de la solution vers l'électrode. Il arrive un moment où c'est la vitesse de diffusion qui va limiter le phénomène de décharge ; on aura atteint le palier d'intensité appelée *intensité limite de diffusion* i_D.

Les propriétés de cette intensité de diffusion sont utilisées en polarographie (cf. paragraphe suivant). Dans des conditions opératoires précises, l'intensité de diffusion est proportionnelle à la concentration en espèce active, ici, le réducteur

$$i_D = kC_{réd}.$$

Le graphe est caractérisé également par le potentiel correspondant à la moitié de l'intensité de diffusion ; on l'appelle *potentiel de demi-vague*, E 1/2. Dans des conditions opératoires données, il est caractéristique de l'espèce qui réagit à l'électrode.

1.2.4. CAS DE PLUSIEURS SUBSTANCES ACTIVES

Les intensités des courants d'électrolyse sont additives ; pour que les graphes de polarisation correspondant à des réactions différentes n'empiètent pas les uns sur les autres, il suffit que leurs potentiels de demi-vague E 1/2 soient suffisamment différents (au moins 100 mV).

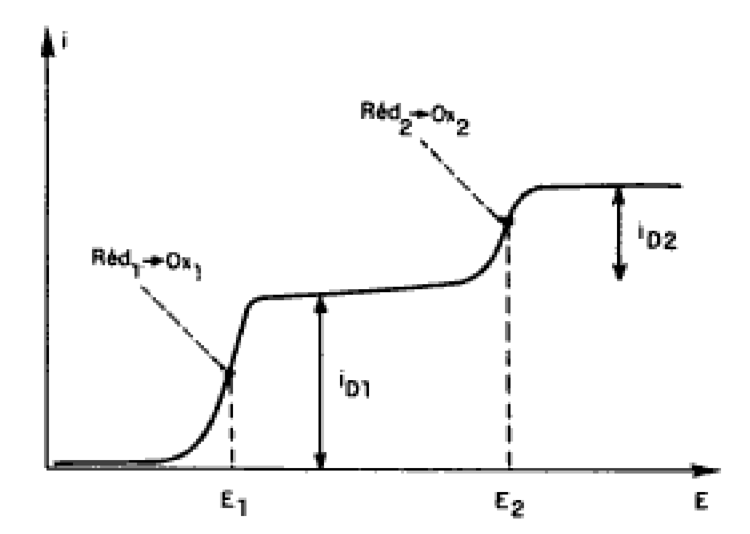


Fig. 16 Cas de plusieurs substances actives.

Ainsi peut-on obtenir le graphe de la figure 16, avec un mélange de deux réducteurs : réd$_1$ (potentiel de demi-vague E_1) et réd$_2$ (potentiel de demi-vague E_2). Les intensités de diffusion correspondant à chaque palier sont :

$$i_{D_1} = kC_{réd_1} \qquad \text{et} \qquad i_{D_1} = k'C_{réd_2}.$$

Exemple avec mélange de substances oxydables et réductibles :

Considérons une solution dans laquelle on a mélangé une solution d'iodure et un peu d'une solution cérique ; il s'est produit la réaction

$$I^- + Ce^{4+} \rightarrow Ce^{3+} + \frac{1}{2}I_2$$

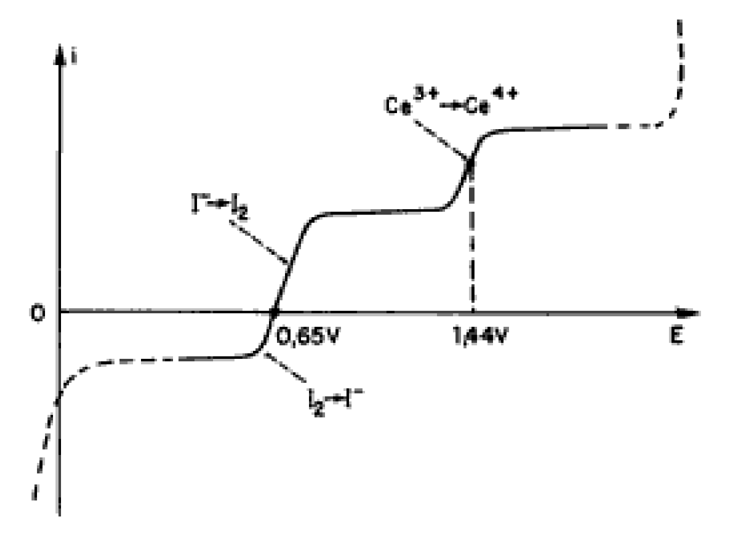


Fig. 17 Présence de substances oxydables et réductibles.

(les ions I^- étant en excès). On obtient alors un mélange :

$$\begin{cases} I_2, I^- : \text{couple rapide} \\ Ce^{3+} : \text{substance oxydable.} \end{cases}$$

Le tracé du graphe $I = f(E)$ de ce mélange est celui de la figure 17 : le courant de réduction de l'iode est compté négativement, d'après les conventions habituelles.

1.2.5. LIMITE DU GRAPHE : RÔLE DU SOLVANT

Dans le cas où le solvant est l'eau, à potentiel élevé, il peut se produire l'oxydation de l'eau ; à potentiel faible, a lieu la réduction des ions H^+ ; les graphes sont donc limités par les deux réactions suivantes :

$$H_2O \rightarrow \frac{1}{2} O_2 \uparrow + 2\,H^+ + 2e^-$$

$$H^+ + e^- \rightarrow \frac{1}{2} H_2 \uparrow .$$

La première a lieu pour un potentiel de l'ordre de 1,7 V avec une électrode de platine ; tandis que la deuxième se passe pour un potentiel de l'ordre de − 0,2 V. Les réactions correspondantes ne montrent pas l'existence d'un palier de diffusion, étant donné la présence du solvant en grande quantité près de l'électrode.

Certaines réactions d'oxydation ou de réduction électrochimique ne pourront donc pas avoir lieu, si leurs potentiels sont au-delà des limites correspondant au solvant. On dit que les substances correspondantes ne sont pas *électroactives* dans ce solvant.

En changeant la nature de l'électrode, on peut déplacer les courbes relatives au solvant. C'est ainsi que le mercure sera utilisé pour étudier la réduction cathodique d'un certain nombre de cations, car le dégagement d'hydrogène nécessite un potentiel très négatif (donc la réduction de l'eau ne gênera pas la réduction des cations étudiés) (fig. 18).

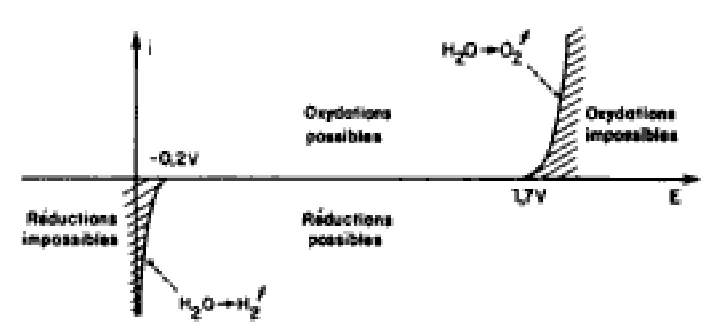


Fig. 18 Limites d'électroactivité de l'eau.

1.2.6. APPLICATIONS DES GRAPHES DE POLARISATION

On peut utiliser la propriété du courant de diffusion (correspondant à un palier) : $i_D = kC_{active}$; l'intensité étant proportionnelle à la concentration de la substance active étudiée, il suffira d'imposer à une électrode le potentiel correspondant au palier de diffusion de cette substance : c'est la *polarographie*.

On peut également réaliser une réaction dans la solution en ajoutant un réactif de précipitation, d'oxydo-réduction ou de complexation. La concentration de la substance active va alors varier ; on peut suivre cette variation par différentes techniques qui constituent *l'ampérométrie* et la *potentiométrie*. La potentiométrie à courant nul ayant déjà été décrite, nous expliquerons, dans ce chapitre, ce qu'est la potentiométrie à faible intensité de courant (cf. Tome 1, chapitre IV, IV.1).

Remarque importante :

Étant donné les faibles tensions imposées aux électrodes, les intensités de courant mesurées sont toujours de *quelques micro-ampères*. Les quantités de substances qui réagissent alors sont extrêmement faibles et ne modifient pas les concentrations des solutions : le calcul montre qu'un courant de 10 μA pendant un quart d'heure provoque la réaction de 10^{-7} mole d'ions monovalents.

2. Polarographie

Cette technique utilise les graphes de polarisation $i = f(E)$, l'intensité de diffusion ayant la propriété d'être proportionnelle à la concentration en espèce active :

$$i_D = k.C.$$

C'est donc une méthode de dosage direct, après étalonnage.

2.1. MONTAGE

Le schéma d'un polarographe est représenté figure 19 : un montage potentiométrique permet de faire varier la différence de potentiel entre deux électrodes :

– *une électrode indicatrice*, à goutte de mercure (généralement) ou électrode de platine tournante ;

– *une électrode de référence*, en général, électrode au calomel saturé (ECS), au sulfate mercureux, etc.

Les polarographes modernes sont accompagnés d'un jeu complet d'électrodes, cellules et accessoires qui permettent d'enregistrer automatiquement le diagramme $i = f(E)$.

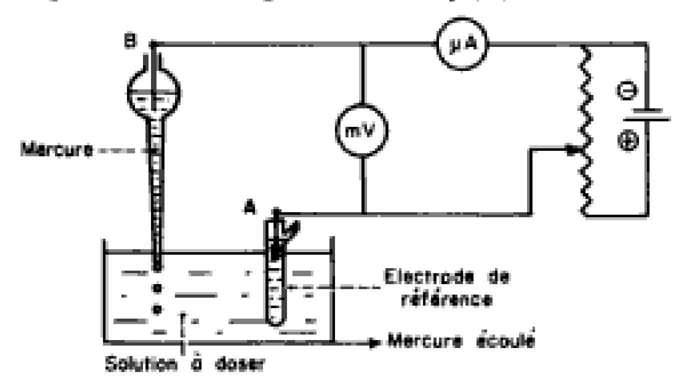


Fig. 19 Montage polarographique.

2.1.1. LE MERCURE

Il doit être parfaitement pur (distillé) ; les gouttes doivent se former avec une vitesse constante et des temps de chute compris entre 0,5 et 5 secondes, selon le diamètre du capillaire et la hauteur de la colonne de mercure.

L'électrode indicatrice (goutte) est donc constamment renouvelée et n'est pas souillée par les réactions électrochimiques qui peuvent s'y produire.

La réduction de l'eau avec dégagement d'hydrogène nécessite sur le mercure une surtension élevée. On peut donc utiliser cette électrode pour étudier la réduction de cations métalliques en solution aqueuse. C'est là une propriété très importante de l'électrode à goutte de mercure.

La seule limitation intervient dans les réactions d'oxydation ; le mercure peut être oxydé en ion mercurique pour un potentiel de l'ordre de 0,80 V :

$$Hg \rightleftarrows Hg^{2+} + 2e^-.$$

Cette électrode sera donc utilisée principalement pour des réactions de réduction ; elle jouera alors le rôle de cathode.

2.1.2. LA SOLUTION

Il est nécessaire qu'un électrolyte, non électroactif, se trouve dans la solution à forte concentration (environ cent fois la concentration de l'élément actif à doser). Les ions de cet électrolyte migrent rapidement sous l'effet du champ électrique et forment une couche d'électricité qui va tendre à annuler ce champ. Les ions actifs, réagissant sur l'électrode, ne seront plus déplacés par le champ électrique, mais uniquement par *diffusion*. C'est ainsi que l'on pourra obtenir le palier de diffusion.

L'électrode de mercure jouant principalement le rôle de cathode, il faut éviter la présence de substances réductibles étrangères. En particulier, l'oxygène de l'air pourra subir facilement cette réduction et il sera nécessaire d'opérer en

présence d'une atmosphère d'azote, par exemple, en ayant pris soin de désoxygéner la solution au préalable.

2.2. LA VAGUE POLAROGRAPHIQUE

La figure 20 représente le tracé d'un graphe $i = f(E)$ correspondant à la réduction d'une substance telle qu'un cation métallique. Pour éviter d'avoir des intensités négatives (cas d'une réduction), on étudie la valeur absolue de l'intensité, $|i|$, en fonction de la valeur absolue de la différence de potentiel, mesurée par rapport à une électrode de référence.

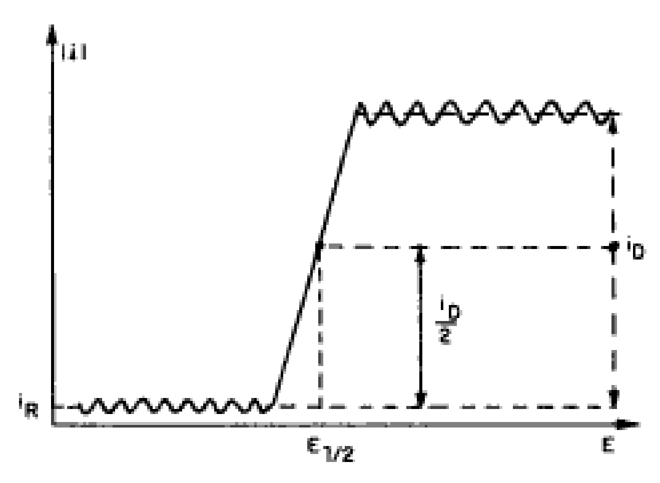


Fig. 20 Vague polarographique.

Cette vague polarographique est caractérisée par :

– *l'intensité résiduelle* i_R, qui existe même si aucune réaction chimique n'a lieu sur l'électrode;

– *l'intensité de diffusion* i_D, ou hauteur de la vague, qui correspond à la réaction chimique (en général une réduction) dont la vitesse est limitée par la vitesse de diffusion de l'espèce active, de la solution vers l'électrode;

– *le potentiel de demi-vague*, E 1/2, qui correspond à une intensité égale à la moitié de l'intensité de diffusion i_D ;

– *les oscillations de l'intensité*, autour d'une valeur moyenne ; ce phénomène est dû au fait que les gouttes nécessitent, au cours de leur formation, un apport de charges (par l'électrolyte non électroactif) pour former la double couche d'électricité. Ce courant est appelé *courant capacitif*. On peut améliorer le rapport intensité de diffusion sur intensité du courant capacitif par divers procédés, tels que la polarographie à impulsion, ou par augmentation de l'intensité i_D, obtenue en agitant la solution, ou encore avec une électrode de platine tournante;

– la présence, parfois, *d'un maximum au début du palier* (fig. 21). Le pic, qu'on observe parfois au début du palier de diffusion, a une forme qui dépend de la concentration en électrolyte non électroactif (une forme aiguë se présente habituellement à faible concentration). Il est dû à des mouvements irréguliers du mercure et au ruissellement du liquide de la solution à la surface de la goutte (ce ruissellement gêne la charge du condensateur dont on a parlé précédemment).

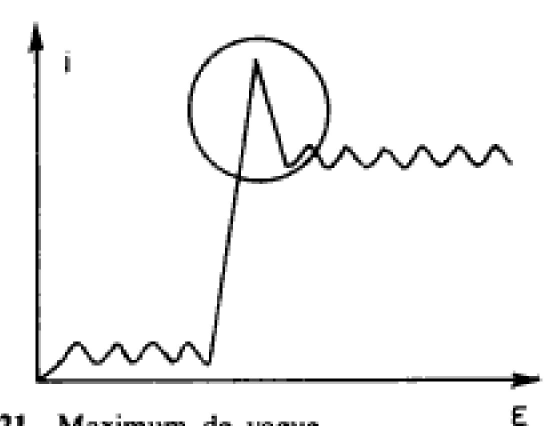


Fig. 21 Maximum de vague.

On peut faire disparaître ce maximum en ajoutant dans la solution de faibles concentrations de substances tensio-actives qui facilitent l'adsorption de la solution sur la goutte (en diminuant le ruissellement). Les substances les plus utilisées sont la gélatine, certains colorants tels que le rouge de méthyle ou des substances de masse molaire élevée : méthyl cellulose, agar-agar, colle, albumine, etc.).

La théorie permet d'expliquer la forme de la

vague polarographique et de montrer l'influence des différents facteurs sur les caractéristiques de la vague.

2.2.1. POTENTIEL DE DEMI-VAGUE : E 1/2

C'est la valeur du potentiel de l'électrode, lorsque l'intensité est égale à la moitié de l'intensité de diffusion. Il correspond également à un point d'inflexion de la courbe : $i = f(E)$ (fig. 20).

Dans un milieu donné, en présence d'un électrolyte donné (coefficients de diffusion et force ionique constants), ce potentiel est caractéristique de la substance électroactive qui réagit à l'électrode. Il est donc indépendant de sa concentration, de la dimension de la goutte et de son temps de formation.

Exemple :

Al^{+3}, en solution à 0,1 mol.l^{-1} en chlorure de lithium : E 1/2 = − 1,75 V par rapport à l'électrode au calomel saturé (ECS).

Pb^{2+}, en solution molaire de soude : E 1/2 = − 0,76 V (ECS).

Le potentiel de demi-vague est, en général, peu différent du potentiel standard du couple rédox utilisé. Il fait intervenir les coefficients de diffusion des espèces du couple.

2.2.2. INTENSITÉ DE DIFFUSION : i_D

C'est la différence entre l'intensité du palier et l'intensité résiduelle. Cette intensité est proportionnelle à la concentration de l'espèce active :

$$i_D = k.C,$$

k dépend :

– des coefficients de diffusion des espèces actives,
– du débit du mercure,
– du temps de formation des gouttes,
– du nombre d'électrons échangés.

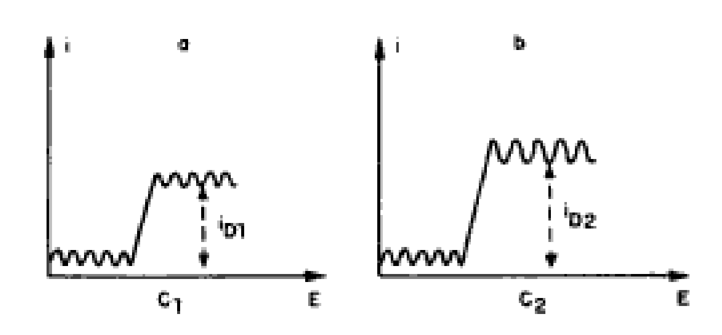
Il est donc important de réaliser les mesures dans des conditions expérimentales bien précises, en particulier au point de vue de l'agitation, qui modifie les coefficients de diffusion des espèces actives.

2.3. APPLICATIONS ANALYTIQUES

Dans des conditions expérimentales bien précises, la détermination du potentiel de demi-vague permet d'identifier une espèce active dans une solution. Mais la principale application se situe en analyse quantitative pour le dosage direct d'une espèce active.

PRINCIPE DU DOSAGE

• ***Tracé des vagues pour une gamme de concentrations*** (fig. 22)



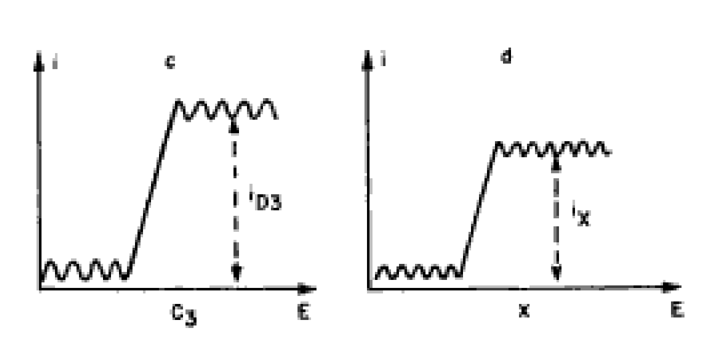


Fig. 22 Vagues polarographiques.

• ***Tracé de la courbe d'étalonnage*** (fig. 22 et 23)

Pourvu que les mêmes conditions opératoires soient respectées, on obtient une droite qui permet de déterminer une concentration inconnue, en traçant la vague de la solution correspondante.

On peut doser ainsi un certain nombre de cations métalliques et de substances organiques réductibles (comportant des groupements nitro : NO_2, nitroso : NO, carbonyle : CO, et diazo : N = N . . .).

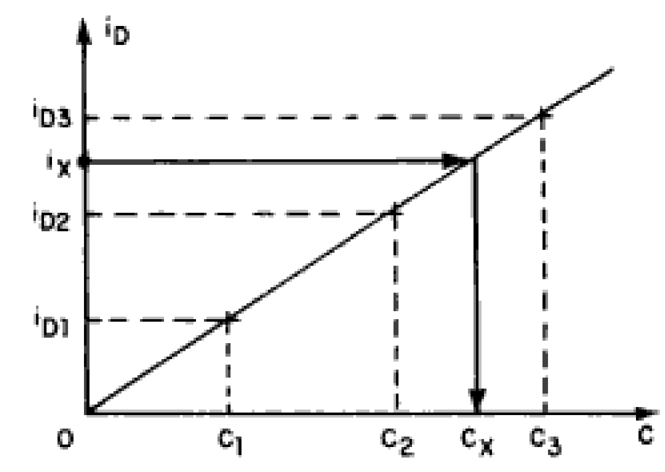


Fig. 23 Courbe d'étalonnage.

3. Ampérométrie

Alors que la polarographie est une technique de dosage direct de concentration, utilisant la propriété de l'intensité de diffusion d'être proportionnelle à la concentration, l'ampérométrie est une méthode de dosage *volumétrique :* on étudie les variations des propriétés de la solution, en ajoutant un volume V de réactif approprié.

On distingue deux méthodes, utilisant les applications des graphes de polarisation :

– l'ampérométrie dite « *à une électrode indicatrice* » qui dérive directement de la polarographie, où il est important de connaître le *potentiel absolu* de l'électrode utilisée;

– l'ampérométrie dite « *à deux électrodes indicatrices* », où l'on raisonne sur la *différence de potentiel* existant entre deux électrodes qui peuvent être identiques (platine) ou différentes (platine, argent, mercure...).

3.1. AMPÉROMÉTRIE A UNE ÉLECTRODE INDICATRICE

3.1.1. MONTAGE

C'est le même qu'en polarographie. On utilise une électrode indicatrice :

– électrode à goutte de mercure (surtout pour les réductions;

– électrode de platine.

Son potentiel est mesuré par rapport à une électrode de référence, à potentiel constant au calomel saturé (ECS), au sulfate mercureux, au chlorure d'argent...

3.1.2. PRINCIPE

On détermine d'abord la vague polarographique de la substance étudiée (fig. 24) ; on recherche alors le potentiel E_1 correspondant au palier de diffusion. L'intensité du courant sera alors i_D :

$$i_D = kC.$$

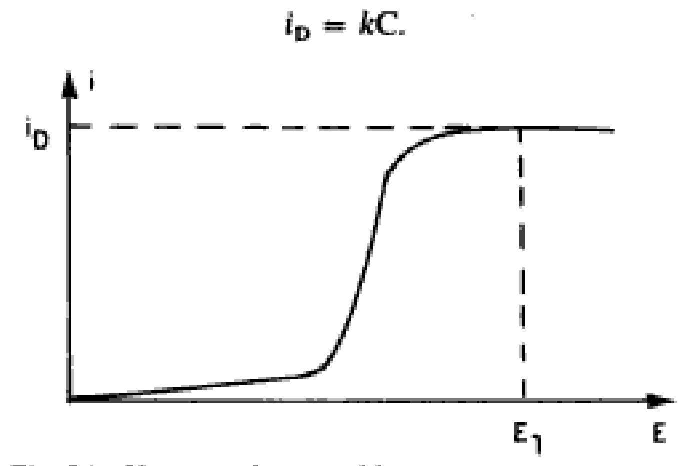


Fig. 24 Vague polarographique.

On ajoute alors dans la solution un réactif de précipitation, d'oxydo-réduction ou de complexation, qui va faire varier la concentration de la substance étudiée (fig. 25). La courbe $i_D = f(V)$ permet de déterminer le *point d'équivalence* de la réaction de dosage.

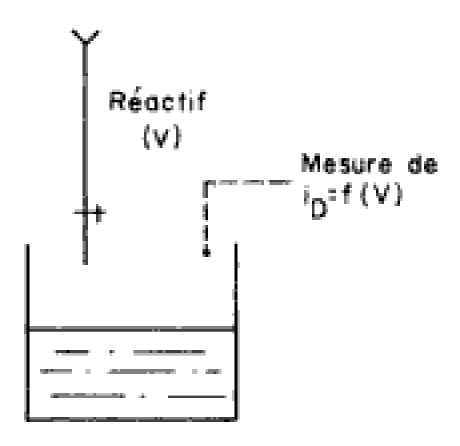


Fig. 25 Dosage ampérométrique.

Remarque :

Si la substance étudiée n'est pas électroactive, on se place à un potentiel correspondant au palier de diffusion du *réactif ajouté*.

3.1.3. EXEMPLES DE DOSAGES

3.1.3.1. Substance réductible dosée par une substance non réductible (fig. 26)

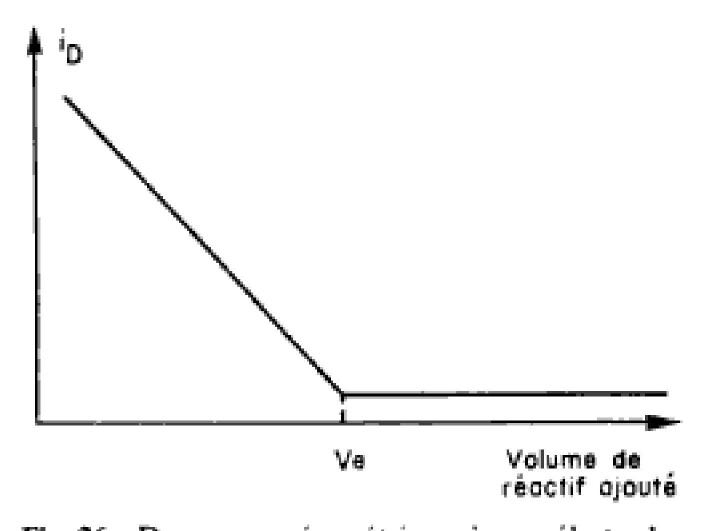


Fig. 26 Dosage ampérométrique à une électrode.

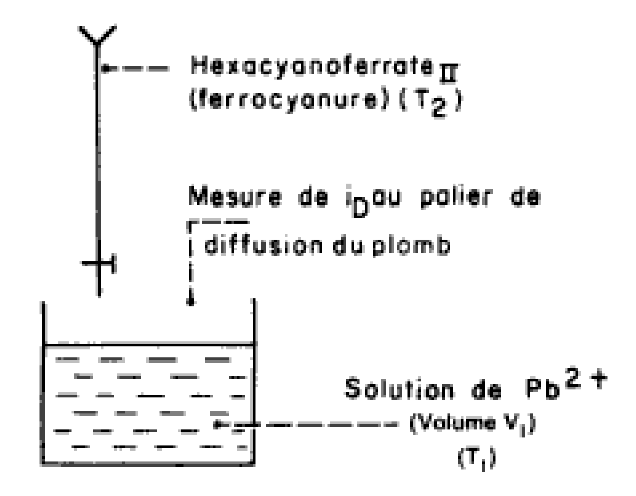


Fig. 27 Dosage ampérométrique.

La réaction utilisée est la précipitation du sel de plomb (fig. 27) :

$$Fe(CN)_6^{4-} + 2\,Pb^{2+} \rightarrow Pb_2Fe(CN)_6 \downarrow$$

Tant que cette réaction a lieu ($V < V_e$), la concentration en Pb^{2+} diminue, ainsi que i_D. Après le point d'équivalence ($V > V_e$), il n'y a plus, dans la solution, de substance réductible au potentiel choisi, $i_D \simeq 0$.

On détermine la concentration molaire de la solution de Pb^{2+} par la relation :

$$V_eT_2 = 2\,V_1T_1 .$$

3.1.3.2. Substance non réductible titrée par une substance réductible (fig. 28)

La réaction utilisée est la complexation des ions ferriques :

$$Fe^{3+} + X^{3-} \rightarrow FeX.$$

Au potentiel choisi, seule la réduction : $Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$ peut avoir lieu; elle correspond à une intensité

$$i_D = k[Fe^{3+}].$$

L'intensité va donc augmenter après le point équivalent (excès de sel ferrique). La relation de dosage sera :

$$V_e . T_2 = V_1T_1 .$$

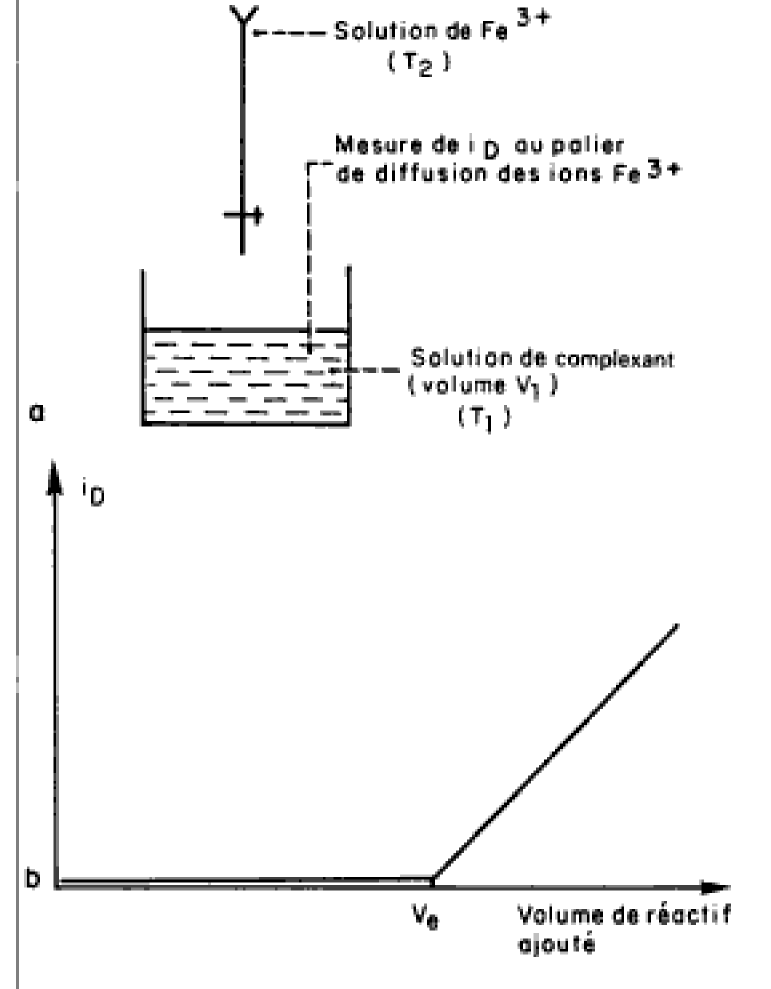


Fig. 28 Dosage ampérométrique d'une substance non réductible par une substance réductible. *a*) Dispositif. *b*) Courbe de titration.

3.1.4. INTÉRÊT DU DOSAGE AMPÉROMÉTRIQUE

Ce type de dosage ampérométrique offre plusieurs avantages :

– il est plus précis que le dosage polarographique ;

– il permet de doser des substances, même si elles ne sont pas électroactives ; il suffit que le réactif soit lui-même électroactif ;

– les types de réactions de dosage peuvent être très variés : oxydo-réduction, précipitation, complexation.

Les courbes obtenues ne sont linéaires que si les réactions utilisées ont des constantes d'équilibre élevées et si l'on corrige l'effet de dilution éventuelle (les intensités sont proportionnelles aux *concentrations*). La correction est analogue à celle que l'on utilise en conductimétrie :

$$i_c = \left(\frac{\text{V initial} + \text{V ajouté}}{\text{V initial}}\right) i_{\text{mesuré}}.$$

Les types de courbes sont très variés ; on les explique à partir du graphe de polarisation de la solution à différents instants du dosage.

3.2. AMPÉROMÉTRIE A DEUX ÉLECTRODES INDICATRICES

3.2.1. MONTAGE (fig. 29)

Les deux électrodes utilisées sont en général en platine poli. On peut utiliser aussi une électrode à goutte de mercure ou une électrode d'argent. La différence de potentiel imposée entre ces deux électrodes est de l'ordre de 100 à 200 mV. On mesure l'intensité (quelques µA) correspondant à un volume V de réactif titrant ajouté : $i = f(V)$.

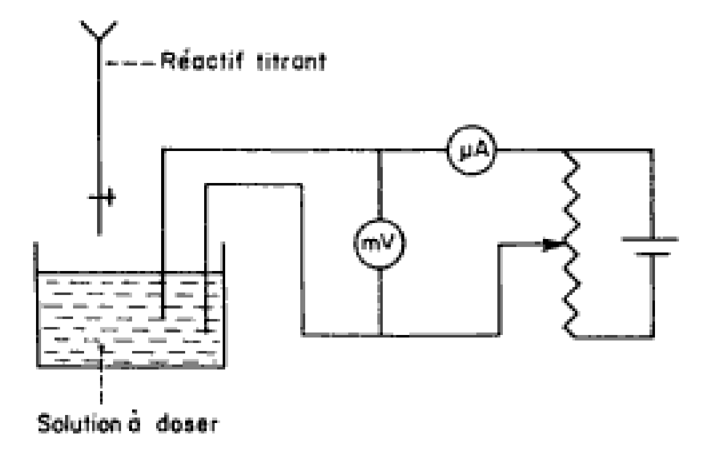


Fig. 29 Ampérométrie à deux électrodes.

3.2.2. PRINCIPE

Pour prévoir les variations d'intensité, il faut connaître le graphe de polarisation de la solution aux différents instants du dosage. Nous

prendrons l'exemple de dosage du fer Fe^{2+} par le cérium, Ce^{4+} :

$$Fe^{2+} + Ce^{4+} \rightarrow Fe^{3+} + Ce^{3+} \quad \text{(fig. 30).}$$

Ce^{4+}
(volume versé V)

Fe^{2+}

Fig. 30 Dosage de Fe^{2+} par Ce^{4+}

• ***Recherche des intensités***

Lorsqu'on impose une faible différence de potentiel entre les électrodes, un courant circule si l'une des électrodes peut jouer le rôle d'anode ($i_{(+)}$), l'autre de cathode ($i_{(-)}$), avec la condition $|i_{(+)}| = |i_{(-)}|$. Reprenons les courbes de la figure 31, l'une après l'autre (fig. 32).

D'où le tracé de la courbe $i = f(V)$ et la détermination de V*e* (fig. 33) appelée « dead-stop »).

3.2.3. INTÉRÊT DE LA MÉTHODE

La méthode peut être utilisée seulement si, dans la solution, existe un couple rédox rapide

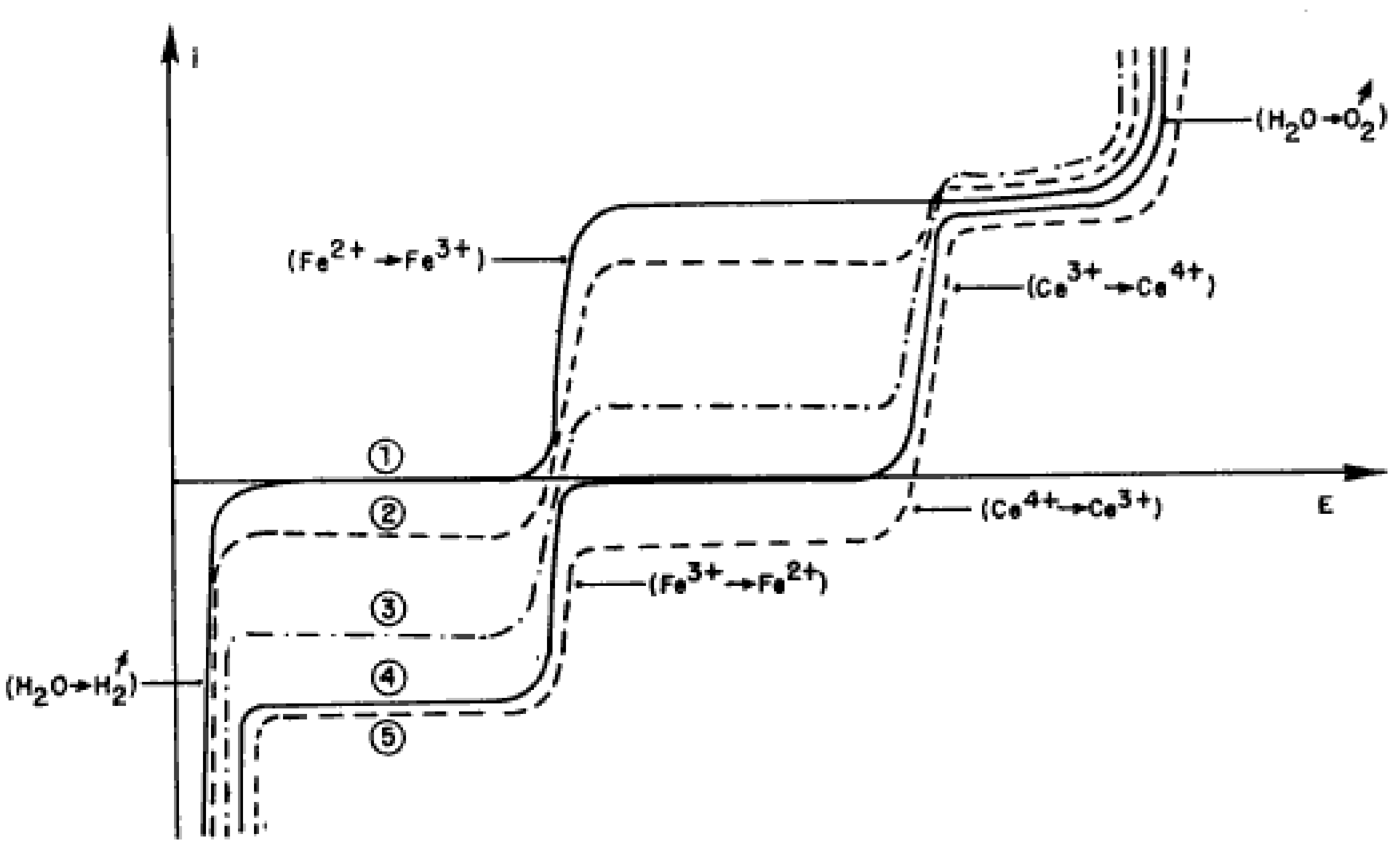


Fig. 31 Graphes de polarisation au cours du dosage.

1 : **V = 0** : seule substance active : Fe^{2+}.

2 et 3 : **0 < V < Ve** : on trouve en solution des ions Fe^{2+}, Fe^{3+} et Ce^{3+}.

4 : **V = Ve** : les ions Fe^{2+} ont disparu.

5 : **V > Ve** : les ions Ce^{4+} en excès peuvent être réduits.

Fig. 32 Courbes de polarisation à différents instants du dosage de Fe^{2+} par Ce^{4+}. 1 : **V = 0** : $i = 0$.

2 : $\mathbf{V} < \dfrac{\mathbf{Ve}}{\mathbf{2}}$: l'intensité est limitée par le palier de diffusion de Fe^{3+}, dont la concentration augmente avec le volume versé (i ↗).

3 : $\mathbf{V} > \dfrac{\mathbf{Ve}}{\mathbf{2}}$: l'intensité est limitée par le palier de diffusion de Fe^{2+}, dont la concentration diminue (i ↘).

L'intensité passe donc par un maximum pour $V = \dfrac{Ve}{2}$.

4 : $\boldsymbol{i} = \mathbf{0}$ (point d'équivalence).

5 : **V > Ve** : l'intensité est limitée par le palier de diffusion de Ce^{4+}, dont la concentration augmente (i ↗).

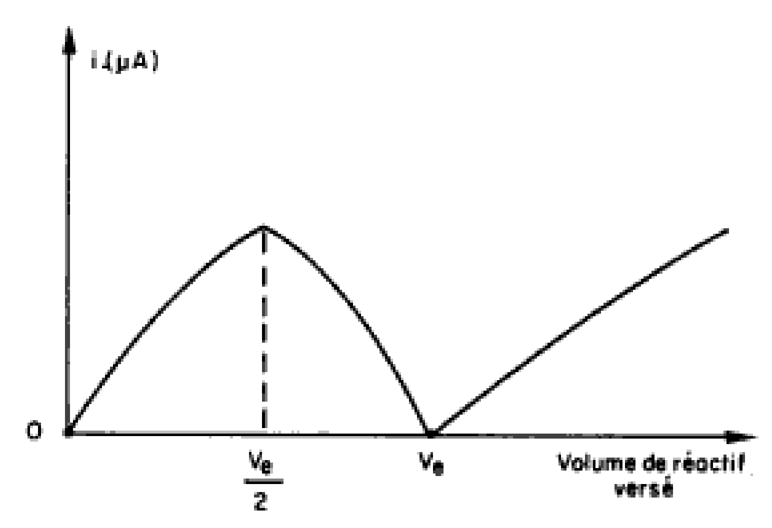


Fig. 33 Courbe ampérométrique à deux électrodes (Fe^{2+} par Ce^{4+}).

(réversible). On peut alors obtenir des allures de graphes très différentes, selon que le réactif initial ou le réactif titrant forme un couple réversible.

Les brusques variations d'intensité donnent des déterminations très précises de point d'équivalence et se prêtent facilement aux enregistrements.

Il y a une variante de la méthode : le *dosage de l'oxygène à l'électrode de Clark.*

- ***Dosage de l'oxygène à l'électrode de Clark***

1) *Description* (fig. 34)

L'électrode de Clark comprend une électrode de platine (ou d'or) et une électrode d'argent, immergées dans une solution de chlorure de potassium. De l'oxygène (dont on veut mesurer la pression par exemple) peut diffuser à travers une membrane en téflon et pénétrer à l'intérieur de la cellule.

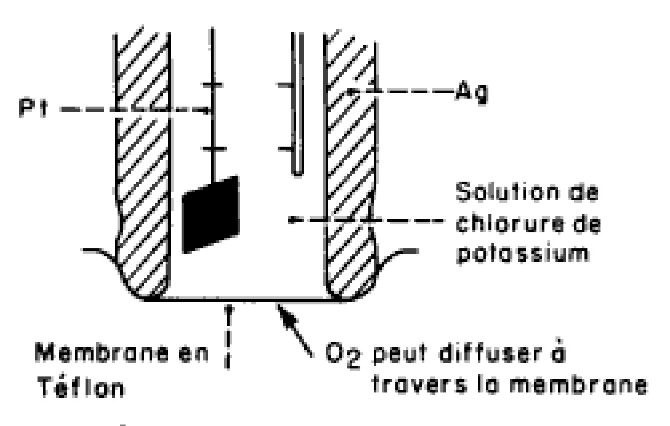


Fig. 34 Électrode de Clark.

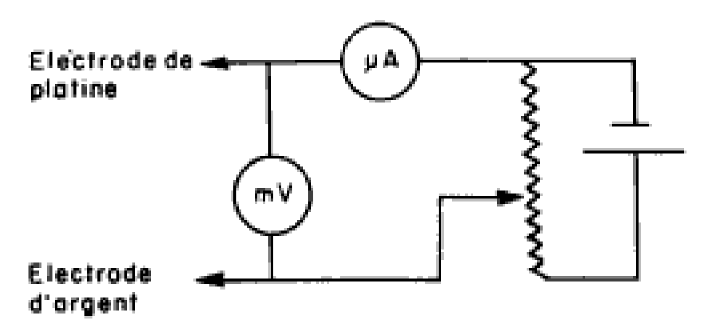


Fig. 35 Montage électrique de l'électrode de Clark.

On impose entre les deux électrodes (fig. 35) une différence de potentiel de l'ordre de 600 à 800 mV, le pôle négatif, qui jouera le rôle de cathode, étant la lame de platine. La mesure de l'intensité va dépendre de la concentration en oxygène de la solution intérieure, donc de la pression d'oxygène à l'extérieur :

$$i = kP_{O_2}.$$

Un étalonnage avec une pression d'oxygène connue permet de déterminer k.

2) *Interprétation* (fig. 36)

On utilise là encore le graphe de polarisation d'une solution contenant de l'oxygène, avec une électrode d'argent (anode).

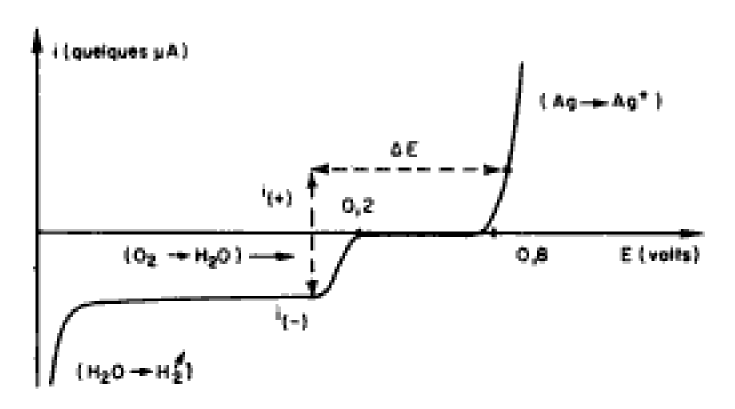


Fig. 36 Graphe de polarisation de l'électrode de Clark.

En imposant une différence de potentiel ΔE de 600 à 800 mV, selon les électrodes, l'électrode d'argent va être anode :

$$Ag \rightarrow Ag^+ + e^-.$$

L'électrode de platine va être cathode :

$$2\,H^+ + 2e^- + O_2 \rightarrow H_2O.$$

L'intensité est limitée par le palier de diffusion dû à l'oxygène. Elle sera donc proportionnelle à la concentration en oxygène dans la solution où sont immergées les électrodes.

4. Potentiométrie à faible intensité de courant

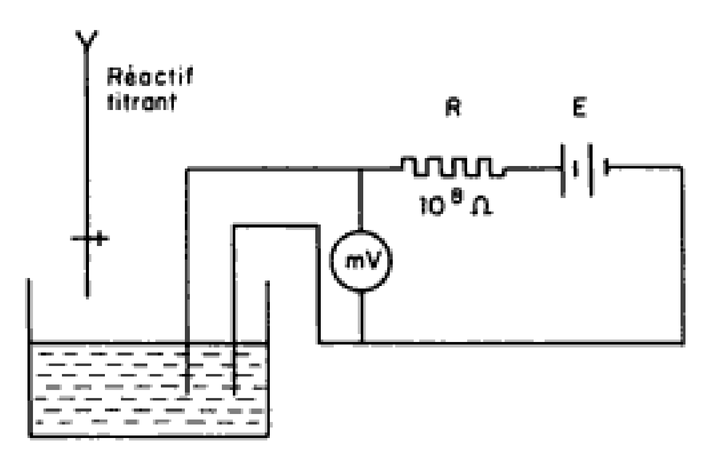


Fig. 37 Potentiométrie à faible intensité de courant.

4.1. MONTAGE (fig. 37)

On fait débiter un courant constant de quelques microampères à un générateur, avec une très grande résistance en série avec deux électrodes généralement en platine. On mesure la différence de potentiel entre ces deux électrodes, à l'aide d'un microvoltmètre électronique.

On étudie les variations de cette tension, en fonction du volume de réactif titrant ajouté :

$$\Delta E = f(V).$$

Fig. 38 Graphes de polarisation à différents instants du dosage de Fe^{2+} par Ce^{4+} (voir fig. 32).

4.2. INTERPRÉTATION DES COURBES $\Delta E = f(V)$

On peut reprendre le dosage précédent : Fe^{2+} par Ce^{4+}. On utilise alors les graphes de polarisation (fig. 38) et on détermine la différence de potentiel ΔE avec une intensité constante $|i_{(+)}| = |i_{(-)}|$.

D'où la courbe obtenue (fig. 39).

Le point d'équivalence correspond à une brève variation de la tension entre les électrodes. L'existence d'un couple réversible se traduit ici par une différence de potentiel pratiquement nulle. La précision obtenue est très grande, à cause de la brusque variation de tension au point d'équivalence.

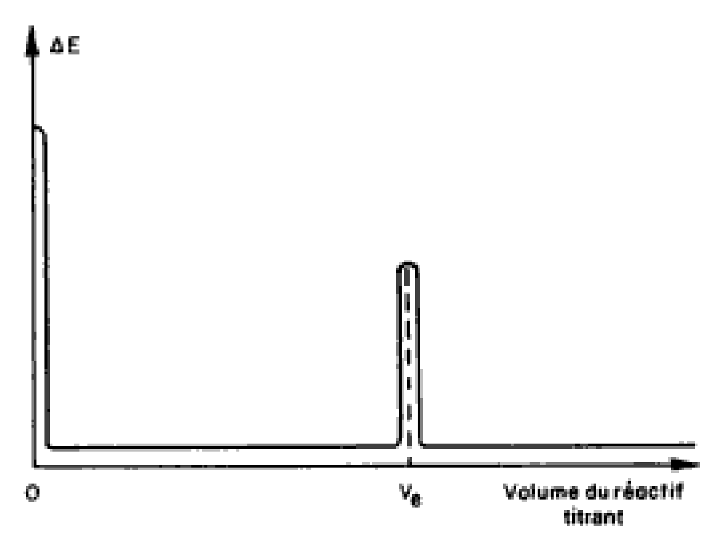


Fig. 39 Dosage potentiométrique à faible intensité de courant, de Fe^{2+} par Ce^{4+}.

III
UTILISATION DES RADIOÉLÉMENTS

La première observation directe d'un phénomène nucléaire fut celle de l'émission de rayonnement, découverte fondamentale faite en 1896 par Henri Becquerel. Pierre et Marie Curie, ayant entrepris l'étude de ce phénomène nouveau le nommèrent *radioactivité*. Ils donnèrent ainsi l'essor à une nouvelle technique, très utilisée aujourd'hui comme méthode d'analyse en raison de ses qualités. La principale est l'extrême sensibilité de cette méthode ; en outre, le fait de pouvoir marquer un atome donné d'une molécule, sans modifier les propriétés chimiques de celle-ci, permet de la suivre et donne des renseignements sur des mécanismes d'action et des vitesses de réaction.

1. Étude de la radioactivité

1.1. LE NOYAU

Différentes méthodes physiques ont permis de montrer que pratiquement toute la masse des atomes est concentrée dans leur noyau, assimilé à une petite sphère, dont le rayon est de l'ordre de 10^{-15} m (alors que l'atome a globalement un rayon de l'ordre de 10^{-10} m, soit 100 000 fois plus grand).

Le noyau est constitué de protons et de neutrons (on appelle *nucléons* les particules élémentaires formant le noyau) :

– le *neutron* est une particule neutre, dont la masse vaut approximativement une unité de masse atomique (l'unité de masse est définie comme la 1/12e partie de la masse d'un noyau de carbone contenant 6 neutrons et 6 protons, et appelé le carbone-12 :

$$1\ \text{u} = \frac{1}{12} \cdot \frac{12}{\mathcal{N}_{av}}\ g = 0{,}166 \cdot 10^{-23}\ \text{g}).$$

La masse exacte du neutron est $m_N = 1{,}008\,665$ u;

– le *proton* est une particule chargée positivement ; sa charge est $+e$ (e étant la charge élémentaire; $e = 1{,}6 \cdot 10^{-19}$ C); sa masse vaut approximativement celle du neutron, c'est-à-dire 1 u; sa valeur exacte est $m_p = 1{,}007\,276$ u.

Un noyau X sera caractérisé par N, le nombre de neutrons, Z le nombre de protons (ou numéro atomique) ; la somme N + Z, qui représente le nombre de nucléons A est appelé *nombre de masse*. On donne au noyau le symbole $^{A}_{Z}X$.

Exemples : $^{3}_{1}H$, $^{32}_{15}P$, $^{131}_{53}I$.

On peut remarquer que A est un entier, alors que la masse exacte du noyau exprimée en u n'est pas entière en général, sauf pour le noyau $^{12}_{6}C$ qui a été choisi comme référence.

Les propriétés chimiques d'un élément et son nom dépendent du nombre de protons Z. Seule sa masse est affectée par un changement du nombre de neutrons.

On appelle *isotopes* des noyaux qui possèdent

le même numéro atomique Z, mais un nombre de masse différent :

^1_1H	^2_1H	^3_1H
Hydrogène	Deutérium	Tritium

(on verra que, pour les éléments légers, les propriétés physico-chimiques de plusieurs isotopes peuvent être différentes : c'est *l'effet isotopique*). Isotope signifie même place (dans la classification périodique).

Pour un élément naturel, la proportion des isotopes est constante ; on l'appelle *abondance isotopique*.

Exemples de quelques isotopes et de leur abondance isotopique à l'état naturel :

^1_1H	^2_1H
99,9844 p. 100	0,0156 p. 100
$^{12}_6C$	$^{13}_6C$
98,892 p. 100	1,108 p. 100

La masse d'un noyau M est inférieure à la somme des masses des nucléons qui l'ont formé ; la différence constitue le *défaut de masse*, ΔM :

$$\Delta M = (Zm_P + Nm_N) - M.$$

Le défaut de masse nous renseigne sur l'énergie de liaison du noyau, c'est-à-dire l'énergie qui a été libérée au cours de sa formation à partir des nucléons pris séparément ; l'énergie de liaison est définie, d'après la relation d'Einstein, par :

$$E_L = \Delta m . c^2$$

(c étant la célérité de la lumière dans le vide.)

Exemple : Énergie de liaison du noyau d'hélium :

La masse du noyau d'hélium ^4_2He est M = 4,001 506 u.

Le défaut de masse est donc :

$$\Delta M = (2.1{,}007\,276 + 2.1{,}008\,665) - 4{,}001\,506$$

$$\Delta M = 0{,}030\,376 \text{ u} = \frac{0{,}030\,376}{6{,}023 . 10^{23}} \text{ g}$$

$$= \frac{0{,}030\,376}{6{,}023} 10^{-26} \text{ kg.}$$

La célérité de la lumière dans le vide étant : $c = 2{,}998 . 10^8$ m.s^{-1}, l'énergie de liaison d'un noyau d'hélium est donc :

$$E_L = \Delta M . c^2 = \frac{3{,}0376 . 10^{-28} . (2{,}998)^2 . 10^{16}}{6{,}023}$$

$$E_L = 4{,}53 . 10^{-12} \text{ J.}$$

On utilise souvent l'électron-volt ;

$$1 \text{ eV} = 1{,}602 . 10^{-19} \text{ J};$$

$$E_L = 27{,}30 . 10^6 \text{ eV} \quad \text{ou} \quad 27{,}30 \text{ MeV.}$$

La mesure des énergies de liaison des différents noyaux permet de comparer leur stabilité ; un noyau ayant une énergie de liaison (par nucléon) très élevée est un noyau très stable ; un noyau, dont l'énergie de liaison par nucléon est faible, est instable et a tendance à se transformer spontanément en d'autres noyaux : c'est la *radioactivité naturelle*.

Les réactions nucléaires permettent de transformer les noyaux ; certaines sont spontanées, naturelles (exemple : radioactivité), d'autres sont provoquées.

L'écriture de l'équation d'une réaction nucléaire fait intervenir un certain nombre de *lois*, dont les principales sont :

- conservation du nombre de protons,
- conservation du nombre de masse.

Exemples :

$$^{12}_6C + ^1_0n \rightarrow ^{12}_5B + ^1_1p$$

$$^{222}_{86}Rn \rightarrow ^{218}_{84}Po + ^4_2He.$$

1.2. DIFFÉRENTS TYPES DE RADIOACTIVITÉ

Nous avons déjà vu que certains noyaux sont instables ; ils se transforment spontanément en d'autres noyaux en émettant une particule ou se désexcitent en émettant un rayonnement électromagnétique. On distingue 3 types d'instabilité :

– *dynamique*, qui correspond à l'expulsion d'une particule, par exemple un noyau d'hélium

(instabilité α), ou à la fission d'un noyau en d'autres noyaux plus petits ;

– β, qui correspond aux transformations réciproques : $p \rightleftarrows n$;

– γ, qui est la désexcitation d'un noyau par émission de rayonnement électromagnétique analogue à l'émission de lumière ou de rayons X par une substance.

1.2.1. INSTABILITÉ β : TRANSFORMATIONS RÉCIPROQUES ENTRE PROTON ET NEUTRON

1.2.1.1. Émission β^-

Ce processus a lieu lorsqu'un neutron du noyau se transforme en proton suivant la réaction :

$$^{1}_{0}n \rightarrow {}^{1}_{1}p + {}^{0}_{-1}e.$$

Cette réaction est possible au point de vue énergétique, car la masse du neutron est supérieure à celle du proton. La variation de masse correspond à de l'énergie cinétique emmagasinée par l'électron alors expulsé du noyau.

L'équation nucléaire globale est donc :

$$^{A}_{Z}X \rightarrow {}_{Z+1}^{A}Y + {}^{0}_{-1}e.$$

L'élément X est transformé en l'élément Y qui le suit dans la classification périodique. On peut donner quelques exemples :

$$^{14}_{6}C \rightarrow {}^{14}_{7}N + {}^{0}_{-1}e \qquad (1)$$

$$^{3}_{1}H \rightarrow {}^{3}_{2}He + {}^{0}_{-1}e \qquad (2)$$

$$^{32}_{15}P \rightarrow {}^{32}_{16}S + {}^{0}_{-1}e \qquad (3)$$

$$^{131}_{53}I \rightarrow {}^{131}_{54}Se + {}^{0}_{-1}e. \qquad (4)$$

L'énergie cinétique maximale des électrons émis peut être calculée par les variations de masse. Les réactions (1), (2), (3) et (4) correspondent respectivement à une énergie E_{max} de 0,155 MeV, 0,017 MeV, 1,71 MeV et 0,605 MeV. Mais tous les électrons émis ne possèdent pas la même énergie (chocs des électrons avec ceux de l'atome ; énergie de recul des noyaux...). La répartition des électrons, selon leur énergie, est donc *continue* (on a montré qu'une partie de l'énergie était cédée à une autre particule, le neutrino, de charge nulle et de masse très petite) (fig. 1).

L'émission β^- existe tant avec des éléments artificiels que naturels. Elle se produit essentiellement lorsque les noyaux possèdent un excès de neutrons par rapport aux protons (exemple $^{131}_{53}I$: 53 protons 78 neutrons).

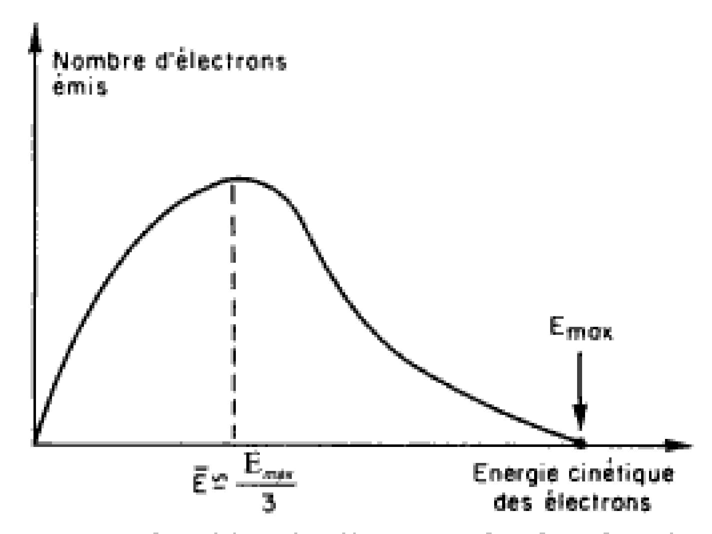


Fig. 1 Répartition des électrons selon leur énergie.

1.2.1.2. Émission β^+

Ce processus n'existe qu'avec des radioéléments artificiels et a lieu lorsqu'un proton se transforme en neutron, en émettant un positon (antiparticule de l'électron, découvert par Andersen en 1932) :

$$^{1}_{1}p \rightarrow {}^{1}_{0}n + {}^{0}_{+1}e.$$

Cette réaction ne semble pas possible au point de vue énergétique, car le proton a une masse inférieure à celle du neutron ; elle ne peut avoir lieu qu'à l'intérieur du noyau. L'équation nucléaire est alors la suivante :

$$^{A}_{Z}X \rightarrow {}_{Z-1}^{A}Y + {}^{0}_{+1}e.$$

Là aussi, l'équation nucléaire complète doit comporter l'émission du neutrino ($^{0}_{0}\nu$), car le spectre d'énergie des positons est continu.

L'élément X se transforme donc en l'élément Y, qui le précède dans la classification périodique.

Exemples :

$$^{30}_{15}P \rightarrow {}^{30}_{14}Si + {}^{0}_{1}e$$

(le phosphore $^{30}_{15}P$ est un élément artificiel, produit par la réaction nucléaire suivante :

$$^{27}_{13}Al + {}^{4}_{2}He \rightarrow {}^{1}_{0}n + {}^{30}_{15}P).$$

$$^{11}_{6}C \rightarrow {}^{11}_{5}B + {}_{+1}^{0}e$$

(le carbone $^{11}_{6}C$ est lui-même un élément artificiel produit, par exemple par la réaction nucléaire suivante : $^{10}_{5}B + {}^{2}_{1}H \rightarrow {}^{11}_{6}C + {}^{1}_{0}n$)

$$^{15}_{8}O \rightarrow {}^{15}_{7}N + {}^{0}_{1}e$$

$$^{13}_{7}N \rightarrow {}^{13}_{6}C + {}^{0}_{1}e$$

(les isotopes $^{15}_{8}O$ et $^{13}_{7}N$ sont formés artificiellement par les réaction nucléaires

$$^{12}C(d, n)^{13}N \quad \text{et} \quad ^{14}N(d, n)^{15}O).$$

Les éléments radioactifs β^+ montrent en général un défaut de neutrons par rapport aux protons.

1.2.1.3. Capture

Ce processus, intervenant lorsque le noyau possède un défaut de neutrons (par rapport aux protons), est en compétition avec l'émission β^+. Il se traduit par la capture d'un électron par un élément X et la formation d'un élément Y qui la précède dans la classification périodique :

$$^{1}_{1}p + {}_{-1}^{0}e \rightarrow {}^{1}_{0}n$$

$$^{A}_{Z}X + {}_{-1}^{0}e \rightarrow {}^{A}_{Z-1}Y.$$

Ce processus, comme les précédents (β^- et β^+), s'accompagne de l'émission d'un neutrino, qui, ici, emporte l'énergie correspondant au bilan de la réaction. L'électron capturé est, en général, pris au cortège électronique de l'atome, parmi les électrons K (les plus proches du noyau).

Exemple :

$$^{7}_{4}Be + {}_{-1}^{0}e \rightarrow {}^{7}_{3}Li.$$

1.2.2. INSTABILITÉ α

C'est la transformation d'un noyau X (en général assez gros : $Z > 82$) en un noyau Y, avec perte d'un noyau d'hélium, c'est-à-dire une particule nommée *particule* α, ayant les caractéristiques suivantes :

- nombre de masse : $A = 4$;
- numéro atomique : $Z = 2$;
- charge : $+2e$;
- représentation : $({}^{4}_{2}He)^{2+}$.

L'équation nucléaire d'un processus α est la suivante :

$$^{A}_{Z}X \rightarrow {}^{A-4}_{Z-2}Y + {}^{4}_{2}He.$$

Le noyau X perd ainsi 2 neutrons et 2 protons ; il se transforme en un élément Y qui le précède de 2 cases, dans la classification périodique.

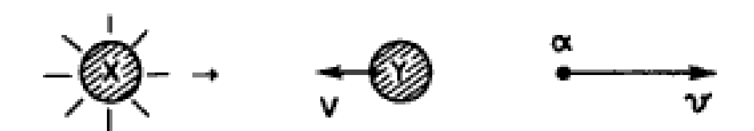
Exemples :

$$^{238}_{92}U \rightarrow {}^{234}_{90}Th + {}^{4}_{2}He$$

$$^{226}_{88}Ra \rightarrow {}^{222}_{86}Rn + {}^{4}_{2}He$$

$$^{222}_{86}Rn \rightarrow {}^{218}_{84}Po + {}^{4}_{2}He.$$

Le bilan énergétique de ces réactions se partage entre l'énergie cinétique de la particule α et l'énergie de recul du noyau qui se désintègre (souvent négligeable devant la première), selon le schéma suivant :



L'énergie de recul peut être suffisante toutefois pour rompre les liaisons chimiques et pour arracher des paquets d'atomes à une préparation solide, par exemple. Si la préparation est liquide, une gouttelette pourra être formée et il se formera un aérosol.

L'analyse magnétique des particules α libérées montre qu'elles se répartissent en plusieurs groupes d'énergie E bien déterminée (spectre de

raies). En effet, l'émission α s'accompagne souvent d'émission de photons γ (cf. III.1, 1.2.3), selon le diagramme énergétique (fig. 2).

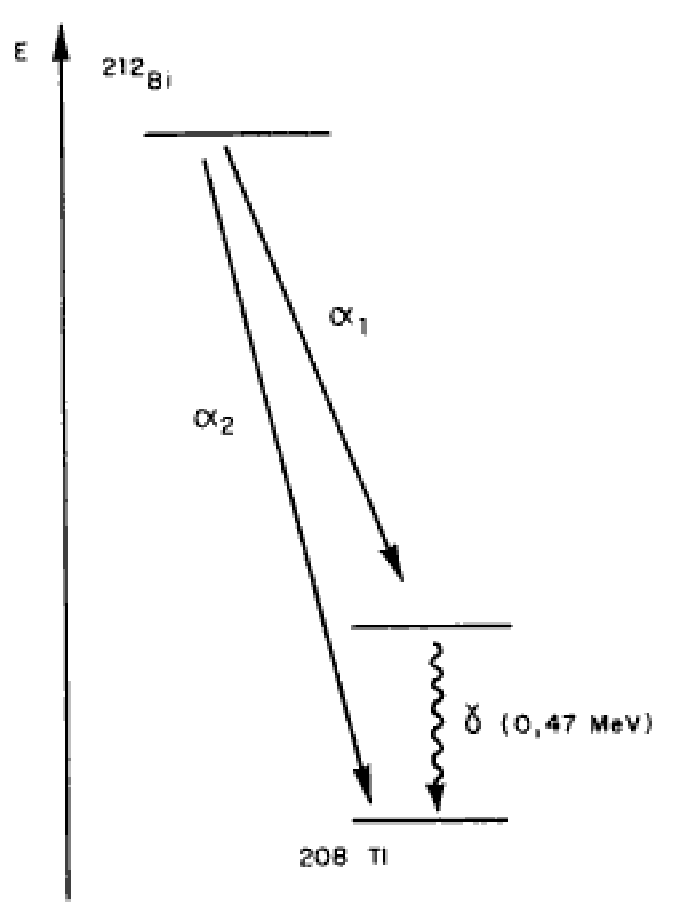


Fig. 2 Diagramme énergétique de l'émission α du noyau.

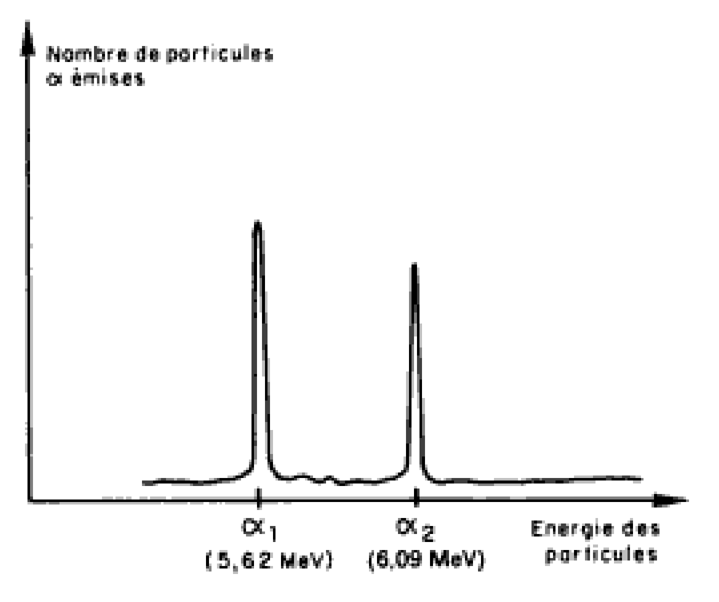


Fig. 3 Analyse magnétique des particules α (spectre de raies).

1.2.3. INSTABILITÉ γ

Elle se traduit par l'émission d'un rayonnement électromagnétique γ (longueur d'onde inférieure à 10^{-2} nm ; propriétés voisines des rayons X), par un noyau excité. Un noyau comporte, en effet, un niveau d'énergie fondamental et une série de niveaux excités qui se rapprochent au fur et à mesure que leur énergie augmente ; de plus, leur durée de vie diminue, car ils sont de moins en moins stables.

L'excitation peut se faire par différents procédés (fig. 4) :

– *réaction nucléaire :* la capture d'une particule forme un noyau à l'état excité ;

– *excitation électromagnétique :* l'absorption d'un photon γ ;

– *excitation consécutive à une désintégration* α *ou* β. C'est ce troisième processus qui intervient dans les substances radioactives (fig. 2). Le noyau Y, formé au cours d'une émission α ou β, se désexcite en émettant des photons γ.

L'émission γ constitue donc un spectre de *raies*, que l'on peut étudier à l'aide de spectrographes γ (cf. III.2, 2.5). On a l'habitude de caractériser cette émission, non par la longueur d'onde des photons émis, mais par leur énergie, exprimée en électronvolts (eV).

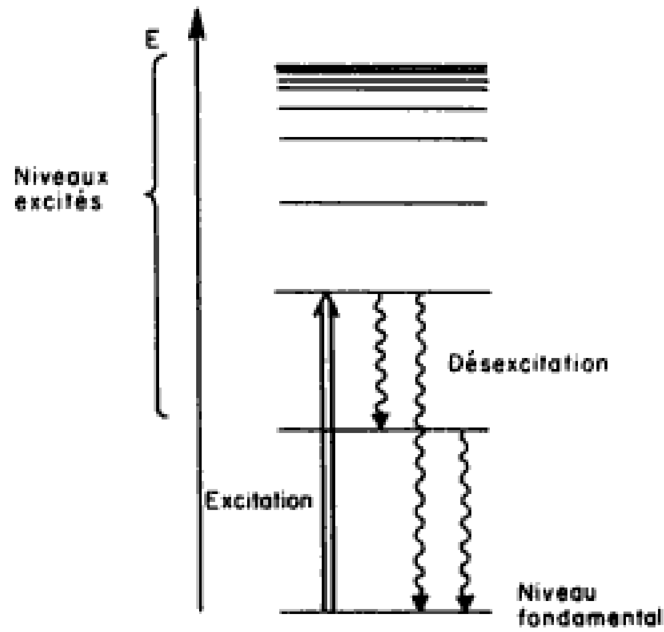


Fig. 4 Diagramme énergétique d'un noyau.

Exemple :

Le spectre γ du césium présente un pic à 662 keV et un autre à 460 keV.

• ***Conversion interne :***

L'excès d'énergie d'un noyau Y, au lieu de se libérer par un photon γ d'énergie $h\nu$, telle que

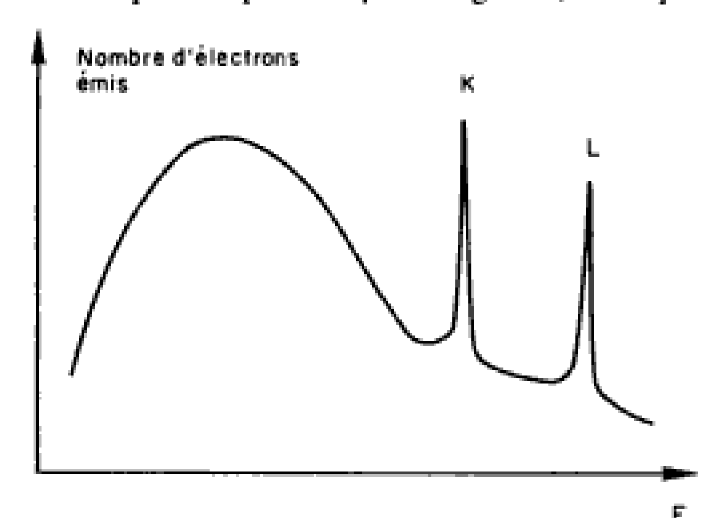


Fig. 5 Spectre d'émission β^- comportant des électrons de conversion interne.

La probabilité d'avoir une émission d'électrons à la place d'un rayonnement γ est grande si le numéro atomique de l'élément est élevé.

1.3. LES RADIOÉLÉMENTS

1.3.1. RADIOÉLÉMENTS NATURELS

Les isotopes naturels, dont le numéro atomique Z est inférieur à 82 sont stables, sauf trois, qui sont radioactifs β^- :

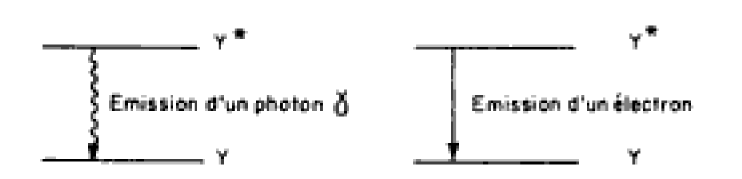
$$^{40}_{19}K, \quad ^{138}_{57}La \quad et \quad ^{176}_{71}Lu.$$

Les éléments lourds (Z > 82) possèdent des isotopes radioactifs β, α et γ, qui dérivent tous de 3 « ancêtres », noyaux à grande période, (cf. III.1, 1.4) et qui sont groupés dans des séries (en familles) caractérisées par le nombre de masse $A = 4p + q$ (p et q étant entiers) (cf. exemples).

Exemples :

Série $4p$	ancêtre : thorium	$^{232}_{90}Th$;	produit final :	$^{208}_{82}Pb$;	6α et 4β.
Série $4p + 2$	–	$^{238}_{92}U$;	–	$^{206}_{82}Pb$;	8α et 6β.
Série $4p + 3$	–	$^{235}_{92}U$;	–	$^{207}_{82}Pb$;	7α et 4β.

$h\nu = \Delta E$, peut provoquer la libération d'un électron périphérique de l'atome, avec une énergie $E_c = h\nu - |W_l|$; W_l étant l'énergie de liaison de l'électron considéré. Le spectre d'émission β^- peut alors comporter un certain nombre de pics, qui se superposent au spectre continu (fig. 5), et qui correspondent aux différentes énergies de liaison des électrons K, L, ... Il y a donc une compétition entre l'émission d'un photon γ et l'émission d'un électron.



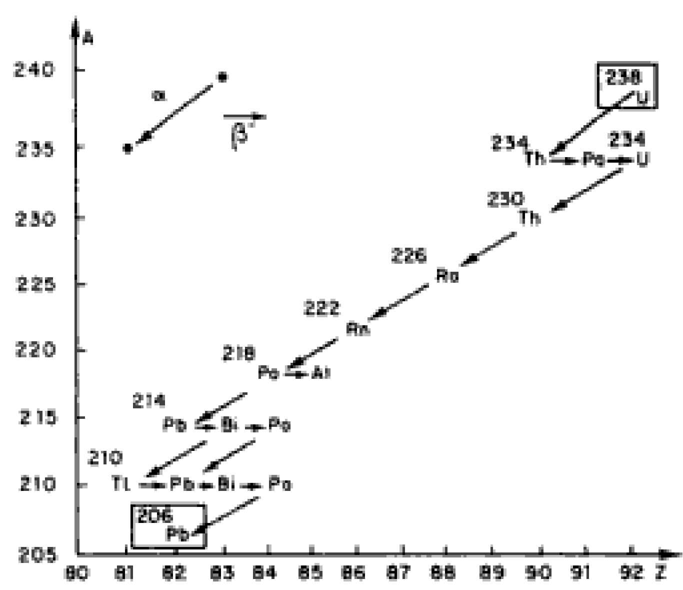


Fig. 6 Famille de l'uranium U conduisant au plomb ^{206}Pb.

La figure 6 indique les transformations qui conduisent de ^{238}U à ^{206}Pb.

1.3.2. RADIOÉLÉMENTS ARTIFICIELS

Ce sont des éléments produits au cours de réactions nucléaires. Les principales de ces réactions mettent en jeu un projectile neutronique. On expose un échantillon convenable à un flux de neutrons que peut produire un réacteur nucléaire. D'autres réactions nucléaires utilisent des projectiles chargés (deutons, particules α...) ; elles nécessitent alors un accélérateur de particules (cyclotron...). Enfin, un certain nombre de radioéléments sont extraits des produits de fission obtenus dans les réacteurs nucléaires.

1.3.2.1. Capture de neutrons

La plupart des réactions de formation des radioéléments avec des neutrons sont des captures radiatives schématisées par (n, γ). C'est ainsi que sont obtenus les isotopes suivants :

$$^{32}P : \; ^{31}_{15}P + ^{1}_{0}n \rightarrow \; ^{32}_{15}P \; (+ \gamma)$$
$$^{59}Co : \; ^{59}Co + ^{1}_{0}n \rightarrow \; ^{60}Co (+ \gamma)$$
$$^{131}Te : \; ^{130}Te + ^{1}_{0}n \rightarrow \; ^{131}Te (+ \gamma)$$

(le technétium, ^{131}Te, donne naissance, par désintégration β^- à l'iode ^{131}I).

On peut également citer la réaction (n, α) de formation du tritium $^{3}_{1}H$:

$$^{6}Li + ^{1}_{0}n \rightarrow \; ^{4}_{2}He + ^{3}_{1}H.$$

Toutes ces réactions nécessitent un flux de neutrons obtenus à partir d'un réacteur nucléaire, étant donné que les neutrons (particules non chargées) ne peuvent être accélérées dans un accélérateur de particules classiques.

1.3.2.2. Réactions avec particules chargées

L'obtention d'isotopes radioactifs des éléments, rencontrés en biochimie, peut se faire par des réactions nucléaires du type (d, n) ou (p, α). On peut citer l'exemple des isotopes suivants :

$$^{11}C : \; ^{13}_{7}N + ^{2}_{1}H \rightarrow \; ^{4}_{2}He + ^{11}_{6}C$$
$$^{13}N : \; ^{12}_{6}C + ^{2}_{1}H \rightarrow \; ^{1}_{0}n + ^{13}_{7}N.$$

Ces réactions demandent un accélérateur de particules. De nombreux laboratoires possèdent de petits cyclotrons permettant de fabriquer les isotopes radioactifs.

1.3.2.3. Obtention à partir des produits de fission

Les combustibles nucléaires donnent naissance à de très grandes quantités d'éléments radioactifs, les produits de fission. Ils constituent un mélange très complexe d'isotopes très différents. Seuls, méritent un effort de récupération, les éléments à *vie longue*. Cependant un élément à vie courte est également extrait, l'iode ^{132}I, à cause de son importance en biologie et médecine.

Les principaux éléments extraits des produits de fission sont les suivants, par ordre d'importance décroissante :

^{132}I : émetteur β et γ
^{137}Co : émetteur β et γ
^{90}Sr : émetteur β
^{144}Ce : émetteur β et γ
^{106}Ru : émetteur β.

1.3.2.4. Propriétés des radioéléments artificiels

La figure 7 représente quelques isotopes légers ; ceux qui sont *voisins* de la ligne N = Z sont stables. Ceux qui sont en *dessous* ont un excès de protons : ils seront radioactifs β^+ ; les isotopes qui sont *au-dessus* de cette ligne seront radioactifs β^-. La radioactivité α ne s'observe que pour des noyaux plus lourds ($Z > 82$).

Au fur et à mesure que le numéro atomique des éléments augmente, le nombre d'isotopes possibles croît. Ainsi, l'iode ($Z = 53$) possède-t-il 21 isotopes radioactifs. La préparation de ces différents isotopes doit donc comporter des opérations de séparation.

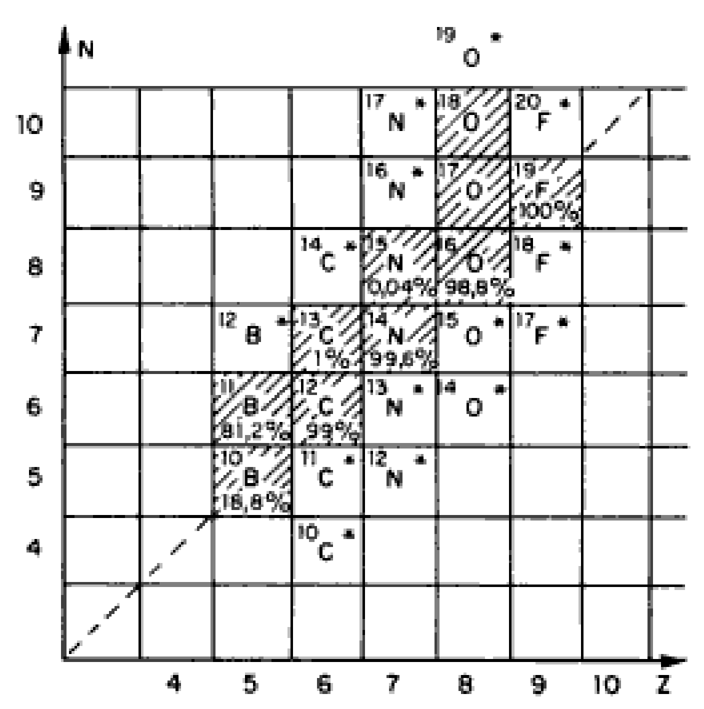


Fig. 7 Quelques isotopes légers (les isotopes stables occupent les cases hachurées avec leur pourcentage à l'état naturel).

1.4. LOIS D'ÉVOLUTION DES SUBSTANCES RADIOACTIVES

1.4.1. LOI FONDAMENTALE : ACTIVITÉ D'UNE SOURCE

On étudie la variation, dans le temps, du nombre de noyaux N de l'élément radioactif. La vitesse de désintégration est alors représentée par $v = -\frac{dN}{dt}$, où dN est la variation du nombre du noyau pendant l'intervalle de temps dt. Cette vitesse de désintégration est appelée aussi *activité de la source.*

La *loi fondamentale* est la suivante : l'activité d'une source est :

– proportionnelle au nombre de noyaux N à l'instant considéré :

$$a = -\frac{dN}{dt} = \lambda N$$

(λ est appelée *constante radioactive* de l'élément considéré) ;

– indépendante des conditions physiques : présence d'autres noyaux, concentrations, liaisons chimiques... ;

– indépendante de la température et de la pression.

- ***Unités***

. L'unité internationale d'activité est le *becquerel* (Bq) qui représente une désintégration par seconde. En général, le nombre de désintégration par seconde étant un nombre très grand, on utilise le *curie* (Ci), qui vaut $3{,}7.10^{10}$ Bq. Le curie représente approximativement l'activité d'un gramme de radium ($^{226}_{88}Ra$) pur. On utilise souvent des sous-multiples du curie, millicurie (mCi) et microcurie (µCi).

- ***Activité massique (ou activité spécifique)***

Un échantillon de substance, du phosphore par exemple, peut comporter une faible proportion de phosphore radioactif ($^{32}_{15}P$). On définit l'activité massique de l'échantillon comme *le rapport de l'activité de l'échantillon à la masse totale de l'élément considéré* (ici le phosphore). On l'exprime donc en $Bq.kg^{-1}$ ou $Bq.mol^{-1}$.

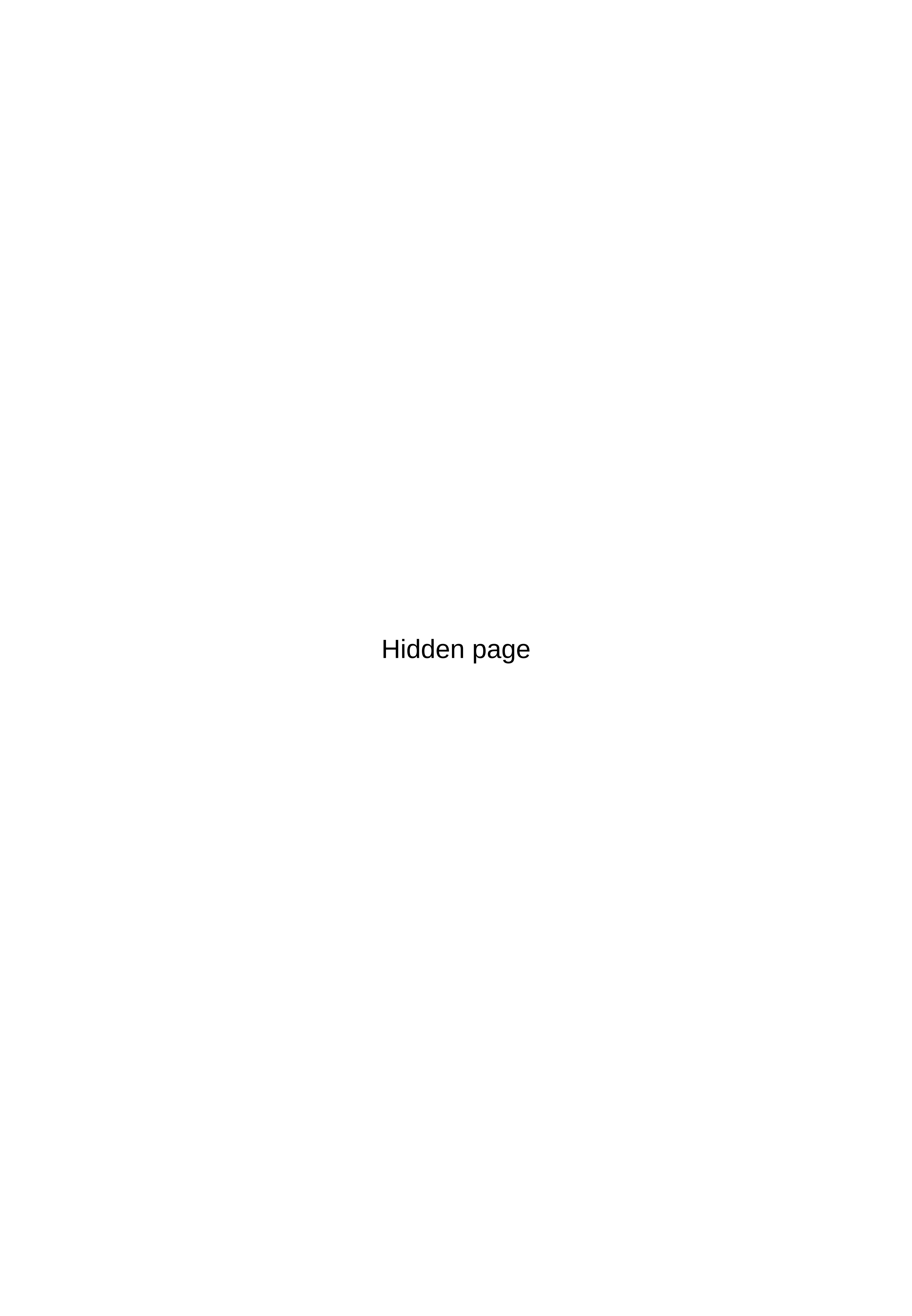
1.4.2. LOI INTÉGRÉE : PÉRIODE D'UN ÉLÉMENT RADIOACTIF

La loi fondamentale représente, au point de vue formel, une loi cinétique d'ordre un. Son intégration donne donc :

$$\frac{dN}{N} = -\lambda\, dt, \qquad \ln N = -\lambda t + \text{cte.}$$

Si N_0 représente le nombre de noyaux de l'élément radioactif à l'instant choisi comme origine ($t = 0$), on peut écrire :

$$\boxed{\ln N = \ln N_0 - \lambda t} \quad \text{ou} \quad \boxed{N = N_0 e^{-\lambda t}.}$$


Hidden page

2. Détection de la radioactivité

Pour détecter la radioactivité on dispose d'un certain nombre de techniques qui permettent de visualiser les particules et d'en mesurer l'intensité :

– visualisation des trajectoires matérialisées, par des gouttelettes de brouillard dans la chambre de Wilson, ou par des grains d'argent dans l'émulsion d'une plaque photographique ;
– mesure de l'intensité d'un rayonnement, à l'aide d'une chambre d'ionisation ;
– comptage des particules émises, dans un compteur Geiger-Müller ;
– mesure du nombre et de l'énergie des particules, à l'aide d'un compteur proportionnel ou d'un compteur à scintillations.

Les particules et les photons ne peuvent être détectés que lorsqu'ils interagissent avec la matière. La nature de ces interactions dépend du corpuscule, de l'absorbeur et de leur énergie cinétique.

2.1. INTERACTION AVEC LA MATIÈRE

2.1.1. CAS DES PARTICULES CHARGÉES, LOURDES (PROTONS, DEUTONS, PARTICULES α)

Ce sont toutes des particules ionisées possédant un défaut d'électrons. L'interaction la plus importante entre ces particules chargées positivement et la matière qu'elles traversent sera d'origine *électronique ;* les particules provoquent l'excitation et surtout l'ionisation des atomes rencontrés. L'énergie captée par les électrons sera transformée par différents phénomènes :

– ionisation, dans la chambre de Wilson ;
– excitation, dans les scintillateurs minéraux ;
– dissociation moléculaire, dans les composés organiques.

Cette interaction provoque un rapide ralentissement des particules. En général le parcours d'une particule lourde est très faible. Un rayonnement α est arrêté par quelques centimètres d'air, par une feuille de papier. Si la source émettrice α se trouve à l'intérieur de l'organisme humain, les particules peuvent provoquer des dégâts importants car leur énergie est dissipée sur une faible longueur.

Les trajectoires des particules lourdes observées à la chambre de Wilson, par exemple, sont rectilignes car des particules ont une inertie suffisante pour ne pas être déviées au cours des collisions.

On appelle *ionisation* spécifique le nombre d'ions formés par unité de longueur. Pour les particules α de quelques MeV, elle peut atteindre la valeur de 5.10^4 ions formés, dans l'air, par cm.

2.1.2. ÉLECTRONS

Les électrons qui traversent la matière perdent leur énergie par ionisation et excitation (pour les énergies faibles) et par rayonnement (pour les énergies élevées). Les trajectoires des électrons, particules très légères, sont fines et sinueuses, surtout en fin de parcours où leur vitesse devient plus faible.

L'ionisation spécifique est beaucoup plus faible que celle des particules lourdes. Pour un rayonnement β de 1 MeV, elle vaut 45 ionisations par cm, dans l'air (contre 5.10^4 pour des particules lourdes).

Les électrons ont donc un parcours plus long que les particules lourdes; (quelques mètres d'air).

Les positons se comportent comme les électrons dans leur interaction avec la matière.

2.1.3. RAYONNEMENT γ

Un photon, traversant la matière, peut être transmis directement, diffusé sans changement de longueur d'onde, diffusé avec augmentation de longueur d'onde, ou absorbé.

2.1.3.1. Absorption

On utilise une loi analogue à celle de la photométrie visible ou ultraviolette (cf. tome 1, chapitre III.1, 3.4), mais on l'exprime en fonction de l'épaisseur de substance traversée et de sa masse volumique.

Soit Φ_0 le flux énergétique incident, Φ le flux transmis, x l'épaisseur traversée :

$$\ln \frac{\Phi}{\Phi_0} = -\mu . x$$

où μ est le coefficient d'absorption linéaire.

En utilisant la masse volumique ρ et la masse spécifique m (masse traversée par unité de surface), cette loi devient :

$$\ln \frac{\Phi}{\Phi_0} = -\frac{\mu}{\rho} \cdot \rho x = -\frac{\mu}{\rho} \cdot m$$

ou :

$$\Phi = \Phi_0 e^{-\frac{\mu}{\rho} m}.$$

$\frac{\mu}{\rho}$, coefficient d'absorption massique, a sensiblement la même valeur, pour un corps donné, quel que soit son état physique. Il est exprimé en $m^2 . kg^{-1}$.

2.1.3.2. Effet photoélectrique

Un rayonnement γ peut provoquer l'émission d'électrons avec une énergie $E = h\nu - W_e$ où $h\nu$ est l'énergie du photon incident et W_e l'énergie de liaison de l'électron. Il s'ensuit un réarrangement électronique de l'atome excité avec émission de rayons X dit « de fluorescence ».

Le coefficient d'absorption massique des rayons γ va être plus grand pour certaines énergies, correspondant aux énergies de liaison des électrons. Le spectre d'absorption aura alors l'aspect suivant (fig. 10).

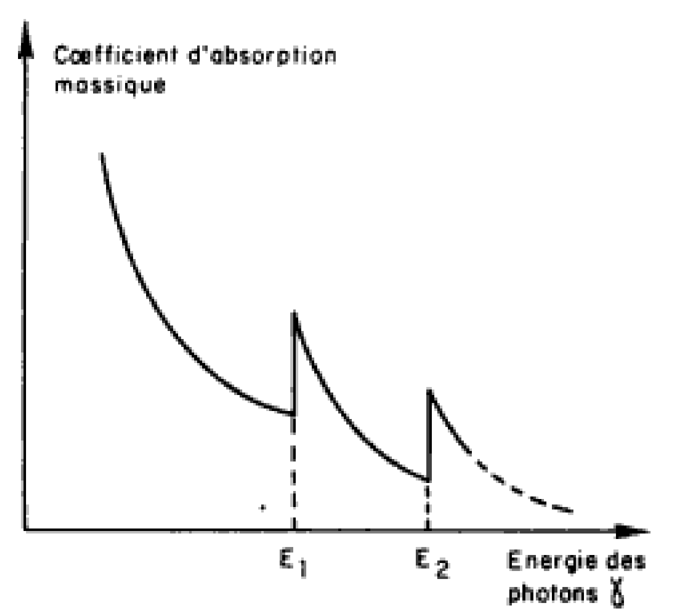


Fig. 10 Variation du coefficient d'absorption en fonction de l'énergie de rayonnement γ.

2.1.3.3. Effet Compton

C'est la diffusion des photons γ incidents avec augmentation de longueur d'onde, c'est-à-dire perte d'énergie. La différence d'énergie est communiquée sous forme cinétique à des électrons. Cet effet a lieu lorsque l'énergie des rayons γ est plus grande et lorsqu'ils interagissent avec des éléments de faible numéro atomique.

2.1.3.4. Création de paires (ou matérialisation)

Si l'énergie du photon incident est supérieure à $2m_0c^2$ (m_0 étant la masse au repos des électrons, m_0c^2 représente l'énergie au repos des électrons, au sens relativiste), le rayonnement peut, en présence d'un noyau ou d'une charge produisant un champ électrique, créer une paire : électron + positon, qui se partagent l'énergie résiduelle ($h\nu - 2m_0c^2$), sous forme d'énergie cinétique.

On peut préciser l'importance des trois phénomènes évoqués ci-dessus, selon la valeur du numéro atomique de l'élément qui reçoit les photons et selon l'énergie de ceux-ci (fig. 11).

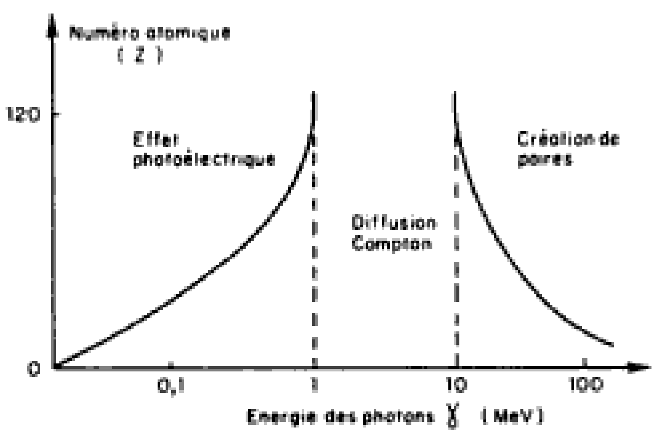


Fig. 11 Importance des phénomènes suivant le numéro atomique, et l'énergie du rayonnement γ.

2.1.4. IONISATIONS PRIMAIRES ET SECONDAIRES ; NOTION D'EXPOSITION ET DE DOSE ABSORBÉE

Les électrons (ou positons), mis en mouvement par les phénomènes que l'on vient de décrire, peuvent à leur tour provoquer des ionisations que l'on appelle *ionisations secondaires.*

Ces trois phénomènes produisent des rayonnements électromagnétiques :

– l'*effet photoélectrique* produit une fluorescence X ;

– la *diffusion Compton* produit un photon diffusé ;

– la *création de paires* peut produire un photon lorsqu'un électron et un positon se rencontrent et s'annihilent.

Dans les trois cas, les rayonnements peuvent à leur tour produire des « ionisations secondaires ».

La mesure de toutes les charges produites est possible dans l'air ; elle permet de caractériser un rayonnement donné ; elle définit la *notion d'exposition.*

L'unité d'exposition est le coulomb par kilogramme ($C.kg^{-1}$). On utilise aussi le *röntgen* (unité admise provisoirement) qui est l'exposition créant dans 1 cm^3 d'air une charge égale à l'unité CGS, c'est-à-dire $\frac{1}{3}.10^{-9}$ C. Cette charge correspond à $2{,}08.10^9$ ions ; le *röntgen* (R) *vaut donc* $2{,}58.10^{-4}$ $C.kg^{-1}$ (*unité d'exposition*).

La création d'un ion nécessitant dans l'air, en moyenne 33,7 eV, l'énergie libérée dans 1 cm^3 d'air par une exposition de 1 röntgen, est donc :

$$\frac{2{,}08.10^9.33{,}7.1{,}6.10^{-19}}{1{,}293.10^{-3}} \simeq 87.10^{-7}\ J.g^{-1}$$
$$= 87.10^{-4}\ J.kg^{-1}.$$

Pour mesurer l'énergie libérée dans un autre milieu, il faut comparer les coefficients d'absorption massique, μ/ρ, du milieu et de l'air. On utilise le *gray* (Gy) comme unité de dose absorbée par un milieu. *Le gray est la dose absorbée correspondant à une énergie libérée de* 1 $J.kg^{-1}$ (on utilise également le rad qui vaut un centigray : 1 rad (ou rd) vaut 10^{-2} Gy).

Dans l'air, une exposition de X röntgens produit une dose absorbée :

$$D \simeq (87.10^{-4}.X)\ \text{gray} = (0{,}87.X)\ \text{rad}.$$

Dans un autre milieu, si f représente le rapport des coefficients d'absorption massique du milieu et de l'air, la dose absorbée est :

$$D' = (87.10^{-4}\ X.f)\ \text{gray} = (0{,}87\ X.f)\ \text{rad}.$$

Pour l'eau et les tissus biologiques mous, soumis aux rayons X usuels, en pratique médicale, f étant de l'ordre de 1,1, une exposition de X röntgens produit une dose absorbée :

$$D \simeq (0{,}87.1{,}1\ X)\ \text{rad} \simeq (0{,}96\ X)\ \text{rad}.$$

On peut donc dire, à 4 p. 100 près, qu'une exposition de un röntgen produit une dose absorbée de 1 rad, dans les tissus mous.

Cette notion de dose absorbée, exprimée en rads, convient bien pour les rayons X et les rayons γ. Lorsqu'on veut exprimer la dose

absorbée par un être vivant, exposé à divers rayonnements, il faut tenir compte du fait que des rayonnements divers peuvent avoir des effets *biologiques très différents.* Des neutrons, par exemple, sont plus actifs que les rayons γ, pour une même exposition. A la suite de nombreuses expériences on a pu évaluer les efficacités biologiques des rayonnements principaux, en prenant comme base l'efficacité de certains rayons X. Pour tenir compte de cette efficacité différente on utilise une unité de dose biologique absorbée, le rem (ou « rad equivalent for men »). La dose biologique, en rems, s'obtient, pour une exposition externe, en multipliant la dose absorbée (en rads) par l'efficacité biologique (EB) :

$$D_{\text{biologique}}\ (\text{rems}) = D_{\text{absorbée}}\ (\text{rads}) \times (\text{EB}).$$

Le tableau suivant indique quelques valeurs d'efficacité biologique :

Rayons X, γ ou β durs	EB = 1
Rayons β mous	EB = 1 à 2
Neutrons lents	EB = 2 à 5
Neutrons rapides, α	EB = 5 à 10.

Lorsqu'on étudie le phénomène d'ionisation dans un milieu on utilise une notion appelée *transfert d'énergie linéique* (TEL), qui exprime l'énergie perdue par le rayonnement par unité de longueur. Dans l'eau, par exemple, le TEL, pour des particules α est de l'ordre de 150 keV/μm ; pour des électrons il est de l'ordre de 1 keV/μm.

2.2. DÉTECTION GLOBALE DE L'IONISATION : CHAMBRE D'IONISATION (fig. 12)

On mesure globalement l'ionisation créée par les divers rayonnements, qu'ils soient électromagnétiques ou particulaires. Les ions créés sont recueillis par deux électrodes, et on mesure la charge produite par unité de temps (intensité d'un courant débité).

Pour entraîner tous les ions, il est nécessaire

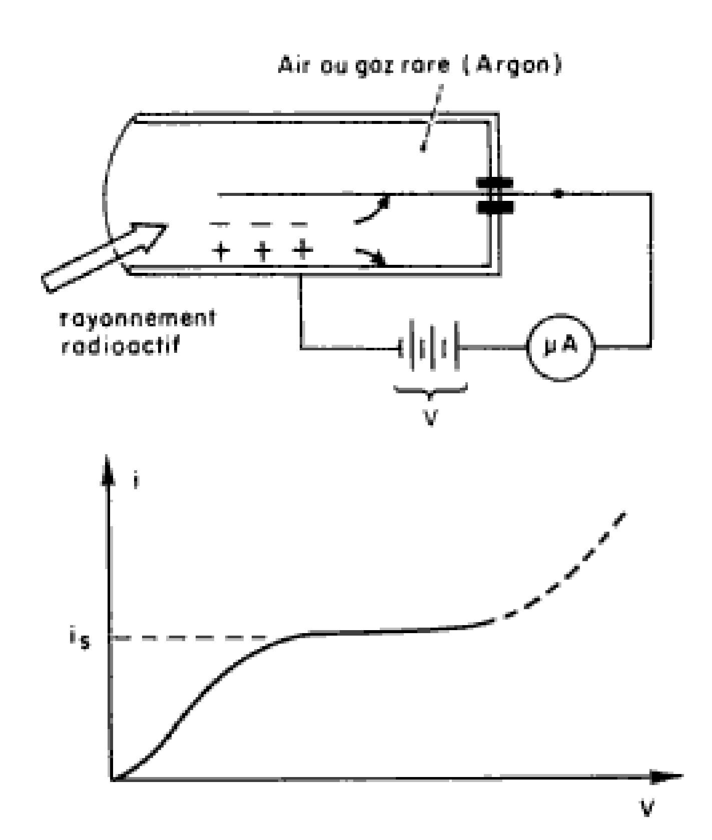


Fig. 12 Schéma d'une chambre d'ionisation et variation de l'intensité en fonction de la tension V.

que le champ électrique à l'intérieur de l'enceinte soit suffisant. On obtiendra donc, pour un même rayonnement ionisant, une intensité qui augmente avec la différence de potentiel appliquée entre les électrodes. Il arrive un moment où l'intensité devient constante (saturation) ; c'est alors que tous les ions formés sont collectés au fur et à mesure de leur formation. La chambre d'ionisation fonctionne donc correctement, car l'intensité i_s est proportionnelle au flux énergétique reçu. Elle permet en ce cas de mesurer la dose d'exposition (en röentgen).

2.3. DÉTECTION INDIVIDUELLE DES PARTICULES : CHAMBRE D'IONISATION

La différence qui intervient, par rapport au montage de la figure 12, est uniquement dans le circuit électrique. L'ionisation créée par *une*

particule dans la chambre d'ionisation est faible. Elle nécessite alors un amplificateur qui permet de visualiser l'impulsion produite (variation rapide de l'intensité).

Le circuit comporte donc :

– un préamplificateur, qui met en forme l'impulsion ;

– un amplificateur, qui augmente l'amplitude de celle-ci ;

– un dispositif de numération, qui dénombre les impulsions ;

– un sélecteur, qui classe les impulsions d'après leur hauteur.

Par exemple, l'appareil ne transmettra que les impulsions, dont l'amplitude est comprise entre deux valeurs V_1 et V_2 (sélecteur à une bande). En faisant varier les extrémités de cette bande, on peut construire l'histogramme donnant le nombre d'impulsions en fonction de leur énergie.

2.4. COMPTEUR DE GEIGER-MÜLLER

2.4.1. CARACTÉRISTIQUE COMPLÈTE DE LA CHAMBRE D'IONISATION

Si on fait varier la différence de potentiel entre les deux électrodes d'une chambre d'ionisation, schématisée fig. 12, pour une particule pénétrant à l'intérieur, la hauteur de l'impulsion recueillie varie selon le schéma de la figure 13.

On obtient quatre domaines (fig. 13) :

– la zone 1, concerne l'utilisation de la chambre d'ionisation déjà décrite (cf. III.2;2.3) ;

– si le champ électrique devient plus intense, les électrons, accélérés, vont produire une ionisation secondaire et l'intensité reçue sera proportionnelle à la tension appliquée. C'est la zone du *compteur proportionnel*, la zone 2 ;

– dans la région suivante, la zone 3, les deux courbes (énergies élevée ou faible) se rejoignent ; l'impulsion a la même amplitude, quelle que soit l'énergie des particules ionisantes. En outre, cette amplitude augmente peu avec la tension : c'est la zone de Geiger (le nombre d'électrons formés peut atteindre 10^{10} pour une particule incidente) ;

– enfin, si on augmente encore la tension, une avalanche électronique produit une décharge qui n'est pas utilisable (zone 4).

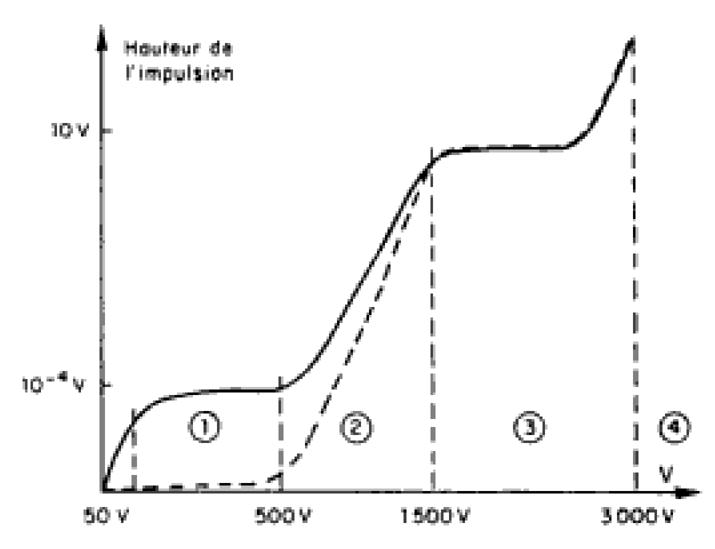


Fig. 13 Influence de la différence de potentiel sur l'intensité recueillie au cours du passage d'une particule donnée. Trait continu : énergie élevée; en pointillé : énergie faible.

2.4.2. PHÉNOMÈNES PRODUITS DANS LE COMPTEUR GEIGER-MÜLLER

Un tube Geiger-Müller est analogue à une chambre d'ionisation (fig. 12). Il est rempli d'un mélange de gaz monoatomique (argon) et de vapeur organique (alcool) sous une pression de quelques centimètres de mercure. Une particule (α ou β) pénétrant à l'intérieur, provoque les phénomènes suivants :

– formation d'un certain nombre de paires d'ions ;

– multiplication des ions primaires. Les

photomultiplicateur d'électrons, par exemple, (cf. Tome 1, III.1, 1.3.2.3);
– un système de comptage, avec sélection d'amplitude.

Un tel compteur permet, soit le comptage global de l'activité d'une mesure, soit le comptage de particules ayant une énergie comprise dans une bande donnée (tracé du spectre en énergie des particules).

2.5.2. SCINTILLATEURS

Leurs caractéristiques essentielles sont les suivantes :

– le rendement lumineux, rapport de l'énergie lumineuse émise à l'énergie reçue par les particules radioactives ;
– la durée du rayonnement consécutif à la réception d'une particule ;
– la transparence à la lumière émise, qui détermine les dimensions du scintillateur ;
– la linéarité, qui permet la mesure directe de l'énergie absorbée en fonction de la hauteur de l'impulsion émise.

On peut citer quelques exemples de scintillateurs : iodure de sodium (NaI) avec traces de thallium (Tl); sulfure de zinc ; anthracène ; naphtalène ; stilbène.

Les scintillateurs organiques ont l'avantage de pouvoir être utilisées en solution ; ils forment ainsi des *scintillateurs liquides.* On peut alors dissoudre l'échantillon radioactif dans le mélange scintillateur lui-même ; dans ces conditions, les pertes de rayonnement sont extrêmement faibles (cf. III.2, 2.5.5).

2.5.3. PHOTOMULTIPLICATEUR D'ÉLECTRONS
(cf. Tome 1, III.1, 1.3.2.3)

L'effet photoélectrique est utilisé pour mesurer le flux lumineux émis par le scintillateur, lors du passage d'une particule radioactive, ou de la réception d'un photon γ.

2.5.4. INSTALLATION DE COMPTAGE

L'installation, schématisée figure 15, comporte le scintillateur collé sur la face externe de la photocathode du photomultiplicateur d'électrons, pour éviter des pertes de lumière. Le préamplificateur met en forme l'impulsion électrique délivrée par le photomultiplicateur. Cette impulsion est alors amplifiée et un compteur dénombre le nombre d'impulsions par unité de temps après sélection énergétique.

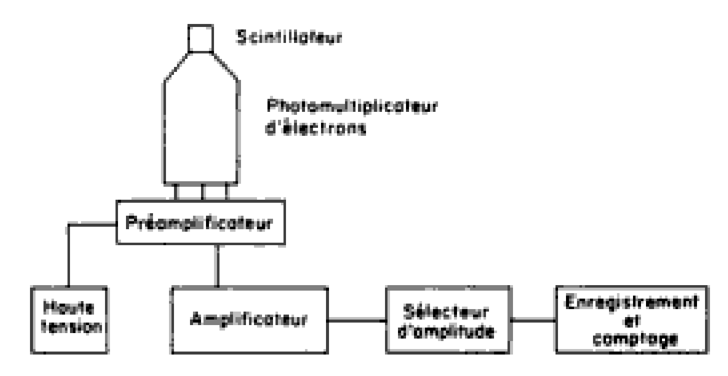


Fig. 15 Schéma d'un compteur à scintillations.

On peut, avec un tel dispositif, étudier le spectre représentant le nombre de particules ou le nombre de photons γ en fonction de leur énergie. Dans le cas de la spectrométrie γ, les photons pénétrant dans le scintillateur produisent les trois effets déjà étudiés ci-dessus (cf. III.2, 2.1.3) :

– *l'effet photoélectrique :* l'électron libéré est absorbé par la substance ; l'énergie absorbée est cédée sous forme de rayonnement : c'est le *pic photoélectrique*, qui est toujours le plus intense ;
– *l'effet Compton :* diffusion du photon γ, en un photon d'énergie inférieure au précédent. L'ensemble forme un spectre continu limité par le *front Compton* dont l'énergie peut être calculée ;
– *la création de paires :* si l'électron et le positon s'annihilent, ils donnent naissance à deux photons γ de 511 keV. Une partie peut être absorbée et libérée sous forme de rayonnement. On obtient les spectres γ dont un exemple est donné figure 16.

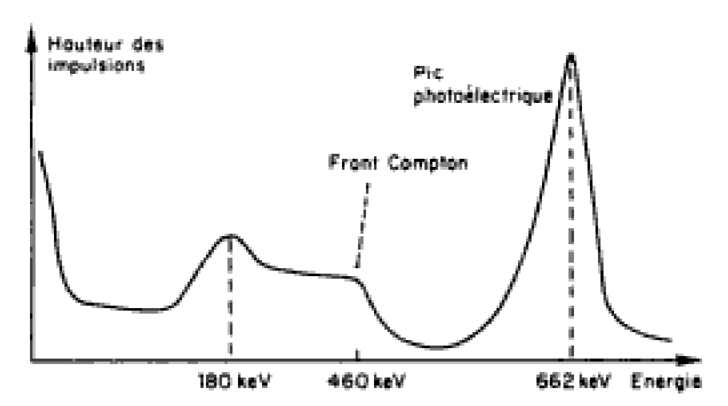


Fig. 16 Spectre γ d'une source ^{137}Cs.

2.5.5. SCINTILLATEURS LIQUIDES

Les biologistes utilisent des scintillateurs liquides pour observer des rayonnements $\beta^{\ominus}$, de faible énergie, produits par les radio-isotopes $^{3}_{1}H$, $^{14}_{6}C$, ou $^{32}_{15}P$. On appelle (cf. III.1, 1.2.1.1) les énergies maximales des rayonnements $\beta^{\ominus}$ de ces éléments :

$$^{3}_{1}H : 17\ \text{keV} ; \quad ^{14}_{6}C : 155\ \text{keV} ; \quad ^{32}_{15}P : 1{,}71\ \text{MeV}.$$

Les particules $\beta^{\ominus}$, de faible énergie, étant absorbées par quelques dixièmes de millimètres d'échantillon, il est nécessaire d'utiliser des scintillateurs liquides où les radioéléments se trouvent au voisinage immédiat des substances scintillatrices.

Les scintillateurs liquides sont composés d'un *solvant* et de un ou de deux *solutés :*

– *le solvant* solubilise les substances scintillatrices, ainsi que les substances radioactives. De plus, il absorbe l'énergie du rayonnement $\beta^{\ominus}$, émis par le radioélément. Cette énergie est alors libérée, par fluorescence. Mais le rayonnement réémis est situé dans *l'ultraviolet* et ne peut être utilisé ainsi (absorption par parois de verre et manque de sensibilité des photocellules, dans ce domaine de longueurs d'onde). Il est donc nécessaire d'ajouter au solvant, d'autres substances fluorescentes appelées *solutés*. Les solvants les plus utilisés sont :

le toluène, le xylène,

le dioxanne

– *les solutés* sont des substances, de nature aromatique (molécules riches en doubles liaisons conjuguées), qui peuvent être excitées par le rayonnement fluorescent provenant du solvant ; leur désactivation produit, à son tour, un rayonnement fluorescent de longueur d'onde plus grande (longueur d'onde λ, comprise entre 400 et 500 nm), reçu par la photocathode d'une cellule photoélectrique ou d'un photomultiplicateur (fig. 16*a*). Les solutés, fluorescents, fréquemment utilisés, dérivent du diphényl-1,4 oxazole (PPO) :

Remarque : Atténuation ou « quenching » :

Toute l'énergie des particules $\beta^{\ominus}$ ne se trouve pas transmise, sous forme de rayonnement visible, par les solutés. Une partie est convertie en énergie non radiative ; ce phénomène est appelé *atténuation* (ou « quenching ») du rayonnement. Il peut se produire selon trois processus :

– la molécule de solvant, activée, subit une

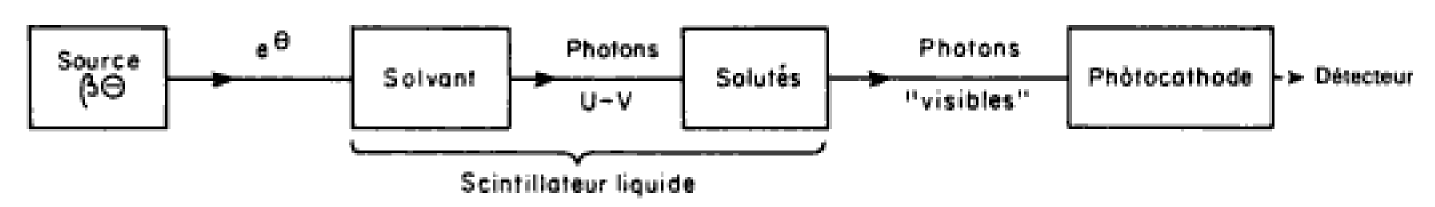


Fig. 16a Principe des scintillateurs liquides.

désactivation *non radiative :* son énergie est utilisée pour former un complexe solvant- soluté, ou elle se dégrade sous forme de chaleur ;

– le rayonnement *fluorescent* du solvant peut être capté par des molécules, elles-mêmes *non fluorescentes*, présentes dans la solution ;

– si la solution comporte des composés *colorés*, il peut se produire une absorption partielle des photons, du domaine visible, émis par les solutés.

L'ensemble de ces phénomènes se traduit par une diminution de l'énergie et du nombre de photons reçus par la photocathode et enregistrés par le compteur.

Lors des comparaisons des radioactivités de différentes solutions, il importe donc que toutes comportent la même composition qualitative. Des corrections peuvent être faites pour obtenir l'activité absolue d'un échantillon.

2.6. COMPTEURS AVEC DÉTECTEURS A SEMI-CONDUCTEURS

Nous avons décrit, dans le tome 1, chapitre III le principe des photodiodes et photopiles utilisés comme récepteurs de flux lumineux. Les semiconducteurs sont utilisés de plus en plus comme détecteurs, soit de particules chargées (e^-, e^+, p, d, α), soit de rayonnements X ou γ.

Dans le cas de particules chargées, on utilise des diodes au *silicium* avec une barrière de surface réalisée par une mince couche d'or (fig. 16*b*) ; dans le cas de rayonnements, on emploie des diodes au *germanium*, dopé au lithium.

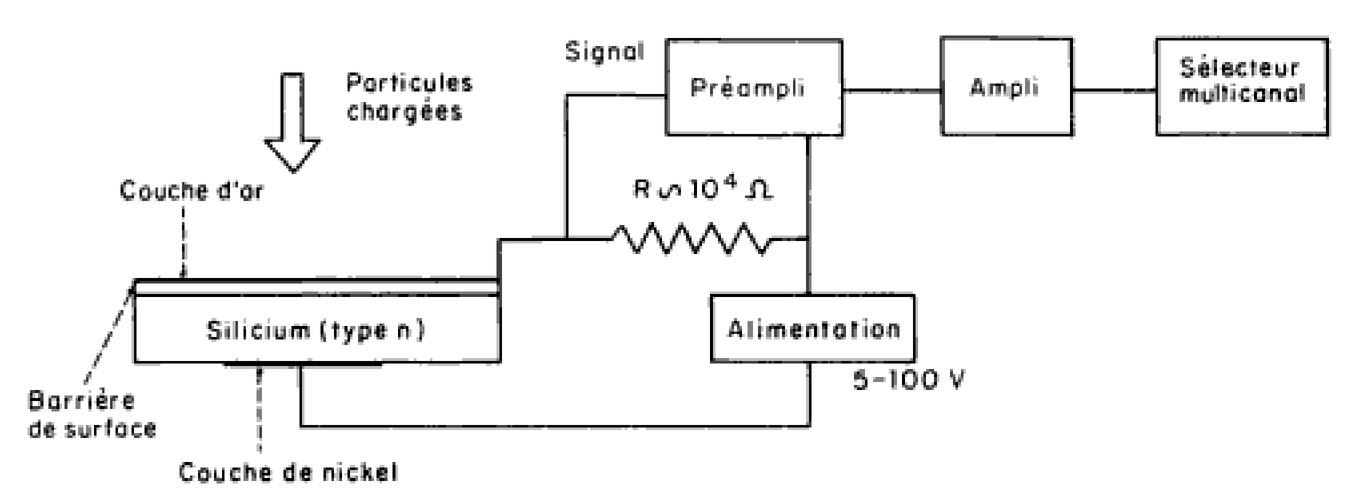


Fig. 16*b* Compteur avec détecteur à semiconducteur.

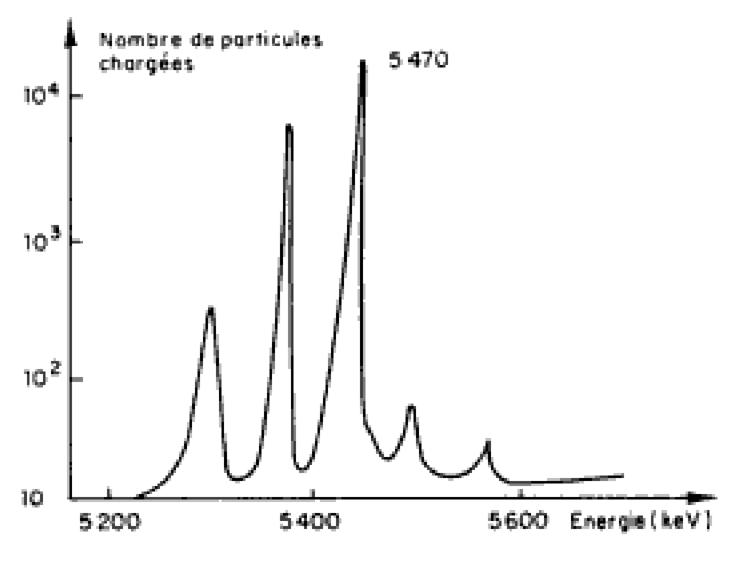


Fig. 16*c* Spectre énergétique enregistré par le sélecteur multicanal.

Dans tous les cas, le flux incident crée dans le semiconducteur des paires électron-trou. Sous l'action d'un champ électrique, ces porteurs de charges sont collectés par des électrodes et font ainsi apparaître une impulsion de tension de l'ordre du millivolt.

Un préamplificateur met en forme cette impulsion avant de l'amplifier. Un sélecteur comporte un grand nombre de canaux (quelques centaines). Chaque canal enregistre les impulsions dont la hauteur est comprise dans une bande d'énergie bien précise. La largeur de chaque bande peut être de l'ordre du keV.

On peut ainsi tracer la courbe de distribution des particules ou des photons, en fonction de leur énergie ; en effet, l'énergie des particules incidentes ou des photons est proportionnelle au nombre de porteurs de charges créés dans la jonction, et donc proportionnelle à la hauteur de l'impulsion. La courbe obtenue constitue le spectre du rayonnement étudié (fig. 16*c*).

L'intérêt des semiconducteurs, par rapport aux détecteurs à ionisation, habituels, est dû à leur grande sensibilité énergétique et, ainsi, à leur grande résolution (aptitude à séparer des rayonnements d'énergie voisine).

3. Technique de mesure de la radioactivité d'un échantillon

3.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Pour les substances en solutions, un volume donné (0,1 à 0,2 cm^3) est pipetté dans une coupelle d'aluminium de faible diamètre et le solvant est évaporé. La coupelle, contenant le résidu radioactif étalé en couche mince, est placée sur un support plastique.

Dans le cas de substances en suspension, il suffit de placer la suspension dans un système de filtration sous vide préalablement muni d'une double rondelle de papier fibre de verre. La rondelle de papier est alors récupérée et déposée directement sur un support plastique.

3.2. MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ

3.2.1. BRUIT DE FOND (MOUVEMENT PROPRE DE L'APPAREILLAGE)

On constate que, même si la source radioactive est enlevée, le système de numération fonctionne encore. Ce phénomène, appelé *bruit de fond*, est dû à de nombreuses causes : rayons cosmiques, radioactivité ambiante, causes propres au système électronique. Ce bruit de fond est déterminé avec un support propre, pendant plusieurs minutes ; on doit le déduire du comptage des différents échantillons. Son influence est importante lorsque les comptages sont faibles.

3.2.2. TEMPS DE COMPTAGE

Tout comptage est sujet à des fluctuations statistiques, dues au fait que les désintégrations des substances radioactives sont effectuées au hasard. En comptant plusieurs fois pendant le même intervalle de temps les désintégrations n_i d'un même échantillon (à durée de vie longue, donc d'activité constante), on obtient diverses valeurs qui se répartissent selon une courbe de Poisson (fig. 16*d*).

L'écart type σ, donné par $\sigma^2 = \frac{\Sigma(n_i - \bar{n})^2}{N}$, où $\bar{n}$ est le nombre moyen de désintégrations et

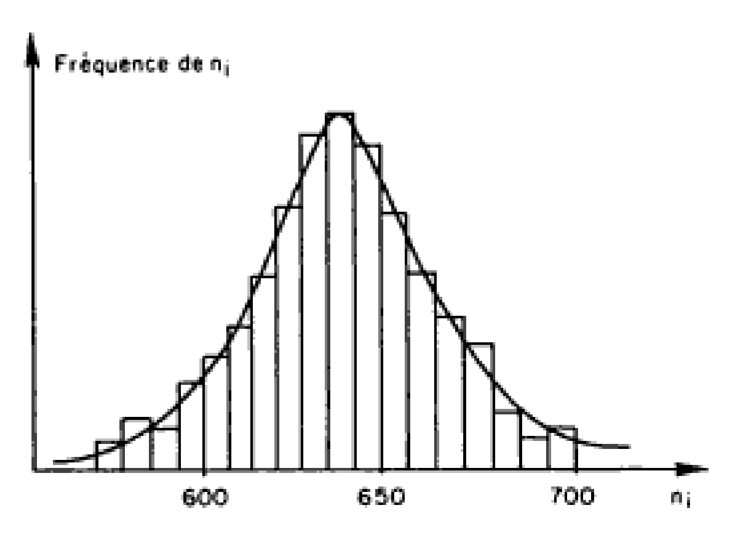


Fig. 16*d* Distribution statistique du nombre de désintégration d'une source radioactive donnée.

N le nombre total de comptages, est à peu près égal à $\sqrt{\bar{n}}$: $\sigma \simeq \sqrt{\bar{n}}$.

On obtient ainsi une évaluation de l'incertitude sur un nombre de désintégrations mesuré, en prenant $2\sigma \simeq 2\sqrt{\bar{n}}$ ou, si l'on fait une seule mesure, à $2\sqrt{n_i}$ et on écrira :

$$\boxed{n = n_i \pm 2\sqrt{n_i}}$$

L'incertitude relative vaut alors :

$$\frac{\Delta n_i}{n_i} = \frac{2\sqrt{n_i}}{n_i} = \frac{2}{\sqrt{n_i}}.$$

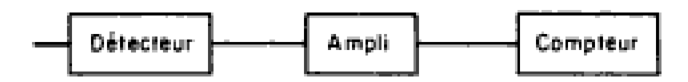
Elle diminue quand le nombre de désintégrations augmente, c'est-à-dire, pour une source donnée, si le temps de comptage augmente.

Exemple :

n_i	Δn_i	$\Delta n_i/n_i$
10^2	20	0,20
10^3	62	0,062
10^4	200	0,020

3.2.3. TEMPS MORT D'UN SYSTÈME DE COMPTAGE

Quand on enregistre les désintégrations de particules avec un détecteur, il existe toujours un intervalle de temps pendant lequel le détecteur est insensible. Dans une chaîne telle que :



il existe essentiellement deux temps morts :

– celui de détecteur, qui est variable; compteur Geiger-Müller : 200 µs ; compteur proportionnel : 10 µs ; détecteur à scintillation : 2 µs ;

– le temps mort du compteur ; s'il est mécanique : 20 ms ; si le compteur est électronique, on évite les échantillons à comptage élevé (> 10^5 coups par minute) et on introduit dans la chaîne une échelle qui ne laisse passer qu'une impulsion sur n impulsions incidentes (n = 10, 10^2, 10^3 ...).

Correction due au temps mort

Soit τ le temps mort du compteur, n le nombre de coups enregistrés pendant le temps t : chaque fois qu'une particule est enregistrée, le compteur est bloqué pendant un temps τ. Le temps réel, où ont été enregistrées les n particules, est donc $(t - n\tau)$. Si le temps avait été réellement t, on aurait donc enregistré :

$$N = n \cdot \frac{t}{t - n\tau}.$$

En utilisant le nombre de coups par unité de temps, on obtient *l'activité de la source :*

$$a = \frac{N}{t} = \frac{n}{t} \cdot \frac{1}{1 - \frac{n}{t}\tau} = \boxed{a' \cdot \frac{1}{1 - a'\tau}}$$

dans laquelle a' représente l'activité mesurée et a l'activité corrigée.

Exemple :

Supposons un compteur pour lequel le temps mort est $\tau = 200\ \mu s$. Quel doit être le taux de comptage pour lequel l'erreur est de 20 p. 100 ? Cela revient à dire que

$$\frac{a'}{a} = 80 \text{ p. } 100 = 0{,}80\,;$$

or :

$$\left|\frac{a'}{a} = 1 - a'\tau = 0{,}8\right| \rightarrow a' = \frac{0{,}2}{200 \, . \, 10^{-6}} = 10^3 \text{ coups/s}$$

$a' = 6 \, . \, 10^4$ coups par minute.

Si a' est supérieur à cette valeur, l'erreur sera plus grande que 20 p. 100.

3.2.4. GÉOMÉTRIE DU SYSTÈME

Différents facteurs affectent la pénétration d'un rayonnement radioactif à l'intérieur du

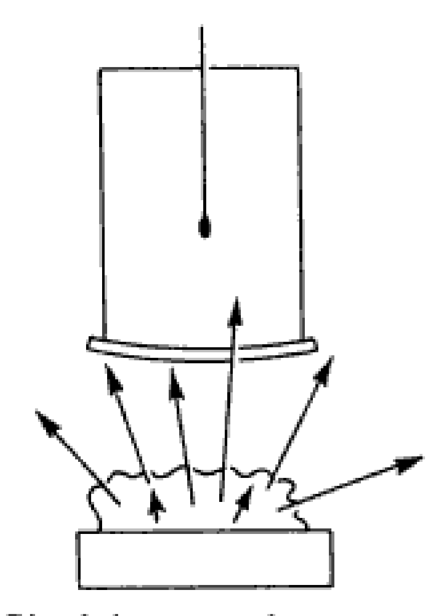


Fig. 17 Géométrie : source-récepteur.

volume de comptage : distance de l'échantillon, surface de la fenêtre, géométrie de l'échantillon (fig. 17). L'autoabsorption à l'intérieur de l'échantillon est un facteur important qui dépend de l'énergie des particules émises, de la nature de la couche et de son épaisseur.

Si la couche a une grande épaisseur, aucune particule n'atteint sa surface. Si elle a une épaisseur très faible, l'absorption peut alors être négligée. On peut étudier l'influence de l'épaisseur de l'échantillon sur l'absorption (fig. 18).

Remarque :

« L'épaisseur », exprimée sur la figure 18, en mg/cm², est due à l'expression suivante :

$$h' = \frac{m}{S} = \frac{\rho \, . \, V}{S} = \rho \, . \, h.$$

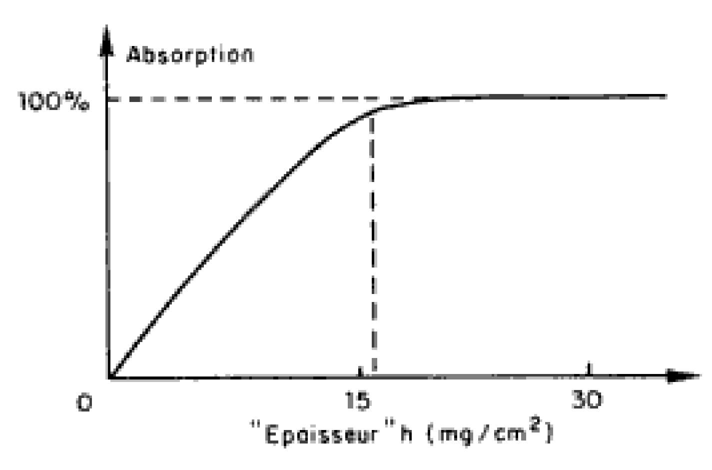


Fig. 18 Courbe d'absorption d'un échantillon de Ba $^{14}CO_3$ en fonction de son épaisseur.

Cette « épaisseur » permet de comparer différents composés, en éliminant l'influence de la masse volumique ρ.

3.2.5. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Le comptage est souvent exprimé en coups par minute, pour chaque échantillon :

$$n_{(\text{cpm})} = \frac{\text{nombre de coups pendant } \theta \text{ minutes}}{\theta} - \text{bruit de fond par minute.}$$

On emploie également l'activité spécifique de la source en nombre de coups par minute, par unité de masse de l'échantillon, qui a l'intérêt de ne pas dépendre de la masse de l'échantillon.

4. Applications de la radioactivité

Nous décrirons tout d'abord les techniques utilisant les radio-isotopes à des fins analytiques, puis nous indiquerons les limites de cette méthode.

On peut distinguer, essentiellement, deux types de techniques :

1) le radioélément est introduit au début d'une expérience, sa radioactivité permettant de le suivre tout au long de celle-ci : l'isotope est alors utilisé comme *traceur* ;

2) le radioélément est formé au cours de l'expérience ; c'est *l'analyse par activation.*

Nous ne reviendrons pas sur les différentes techniques d'obtention des radio-isotopes, étudiées au paragraphe 1.3.2.

4.1. ANALYSE PAR ACTIVATION

L'analyse par activation comporte deux étapes :

– une première étape où des quantités connues de l'échantillon, d'une part, et de l'étalon, d'autre part, sont irradiées, pour obtenir une radioactivité suffisante de l'élément à doser. Cette étape nécessite l'emploi de générateurs de particules : sources émettrices α, piles atomiques libérant des neutrons, cyclotrons accélérant les particules chargées α, *d*, *p*...

Après cette irradiation, dans une deuxième étape, on mesure la radioactivité de l'élément X, à doser. On obtient l'activité $(a_X)_0$ pour l'étalon, et a_X pour l'échantillon. Si $(m_X)_0$ et m_X représentent la masse de X dans l'étalon et dans l'échantillon, on en déduit :

$$m_X = (m_X)_0 \frac{a_X}{(a_X)_0},$$

puisque l'activité est proportionnelle à la masse de l'élément X, radioactif.

Dans le cas le plus favorable, où seul l'élément à doser est rendu radioactif au cours de l'irradiation, la simple mesure de radioactivité suffit. Dans de nombreux cas, plusieurs radioéléments sont formés ; il faut alors les distinguer par des méthodes *physiques* mettant en jeu les caractéristiques du rayonnement, période ou énergie (cf. 4.1.2). Souvent l'analyse par activation nécessite la séparation *chimique* de l'élément à doser. Après irradiation, l'échantillon et l'étalon sont dissous, et l'élément recherché est séparé. Des techniques de chromatographie peuvent être utilisées.

4.1.1. FACTEURS DÉTERMINANT LA SENSIBILITÉ DU DOSAGE

C'est l'étape d'activation qui limite, essentiellement, la sensibilité du dosage. Les principaux facteurs sont les suivants :

– *temps d'irradiation :* nous avons vu, au paragraphe 1.4.4, que la radioactivité d'un élément irradié augmente avec le temps jusqu'à une valeur maximale dite de saturation (fig. 19).

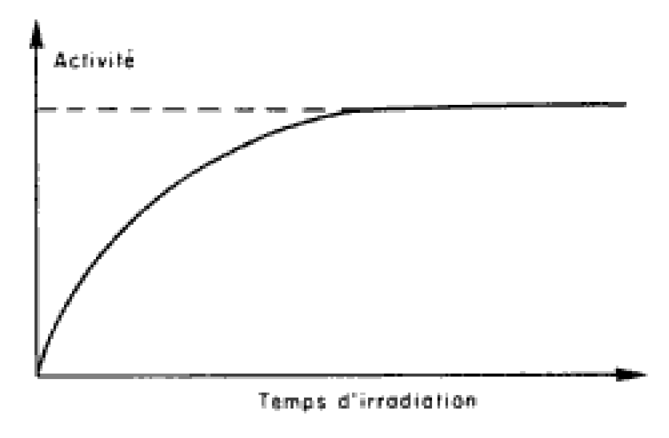


Fig. 19 Variation de l'activité d'une substance en fonction du temps d'irradiation.

La saturation correspond à l'égalité du nombre d'atomes radioactifs formés et du nombre d'atomes qui se désintègrent. Au bout d'un temps égal à 4 fois la période du

radioélément, son activité est environ 94 p. 100 de celle obtenue à la saturation. Il est donc inutile d'irradier au-delà :

– *flux de particules :* l'activité spécifique d'un élément, à la saturation, est proportionnelle au flux de particules irradiantes. L'analyse sera plus sensible si cette activité est plus élevée, donc si le flux de particule est plus intense. C'est cette raison qui rend l'emploi, par exemple, de piles à haut flux de neutrons, plus intéressantes que d'autres sources plus faibles de neutrons ;

– *nature de l'élément à doser :* les divers noyaux captent les mêmes particules de façon différente.

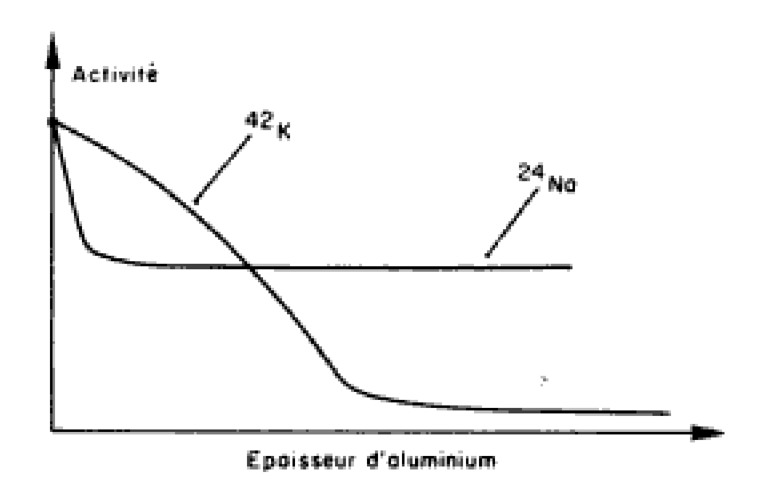
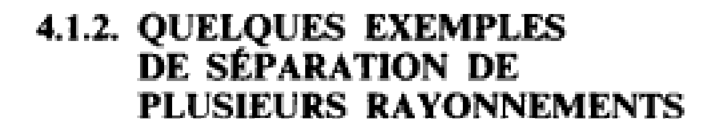


Fig. 20 Courbes d'absorption des rayonnements β du sodium et du potassium par l'aluminium.



4.1.2. QUELQUES EXEMPLES DE SÉPARATION DE PLUSIEURS RAYONNEMENTS

4.1.2.1. Différence de période

Si on dose le fluor en présence de chlore, l'irradiation aux neutrons donne les radio-isotopes ^{20}F (T = 12 s) et ^{38}Cl (T = 35 min). Les périodes étant très différentes, le dosage du chlore est aisé. On peut l'appliquer au dosage des hauts polymères.

4.1.2.2. Différence d'énergie

L'énergie des rayonnements est une autre caractéristique, utilisée pour distinguer deux éléments formés au cours d'une irradiation. Une méthode consiste à effectuer des mesures d'absorption par des feuilles d'aluminium (pour un rayonnement β) ou de plomb (pour un rayonnement γ) (fig. 20).

Une autre méthode utilise les scintillateurs (rayonnement γ). La hauteur de l'impulsion reçue par le dispositif électronique (cf. III.2, 2.5) est liée à l'énergie du photon γ détecté. La *sélection* des impulsions, selon leur hauteur, permet de distinguer des photons γ dont l'énergie est située dans une bande déterminée.

4.1.2.3. Différence de radioactivité

Si les particules émises par deux radioéléments sont différentes (exemple β^- et β^+) une séparation peut être réalisée par un champ magnétique.

4.1.3. EXEMPLE DE DOSAGE PAR ACTIVATION

On peut décrire une méthode de dosage de l'oxygène. L'échantillon à doser est mélangé à du carbonate de lithium (Li_2CO_3). Sous irradiation de neutrons, le lithium est transformé en tritium selon la réaction :

$$^{6}Li + n \rightarrow \alpha + {}^{3}_{1}H.$$

Les noyaux de tritium, formés avec une grande énergie cinétique, réagissent avec l'oxygène selon la réaction :

$$^{16}O + {}^{3}_{1}H \rightarrow n + {}^{18}F.$$

Le fluor ^{18}F a une période T = 112 min; la mesure de son activité est donc facile et le dosage de l'oxygène par cette méthode a une grande sensibilité (10^{-9} g).

4.2. MÉTHODE DES TRACEURS

Cette technique utilise un isotope radioactif, pour suivre le comportement chimique ou biologique d'une molécule ou d'un atome, ou pour le doser. Elle présente l'intérêt de ne pas dépendre directement d'un appareil d'irradiation (pile ou accélérateur). Un radioélément de période suffisamment longue peut être utilisé dans tout laboratoire disposant d'une installation de comptage.

4.2.1. ANALYSE RADIOMÉTRIQUE

La première méthode employée consiste à utiliser, au lieu d'un réactif chimique ordinaire, un réactif radioactif. On peut donner quelques exemples :

– *dosage du baryum.* Dans les méthodes classiques, l'acide sulfurique, ajouté, précipite le sulfate de baryum que l'on pèse. La méthode radiométrique consiste à introduire de l'acide sulfurique marqué par du soufre ^{35}S. La pesée est alors remplacée par la mesure de la radioactivité du précipité de sulfate de baryum ;

– *dosage du magnésium,* par précipitation du phosphate ammoniaco-magnésien manqué par du phosphore ^{32}P;

– *dosage de l'argent,* par précipitation de l'iodure d'argent AgI marqué par ^{131}I.

Quelques radioéléments, à période longue, tels que ^{14}C, ^{35}S, ^{32}P, ^{36}Cl, ^{131}I, etc., suffisent pour marquer les réactifs utilisés dans un grand nombre de dosages classiques.

4.2.2. DILUTION ISOTOPIQUE

Cette méthode permet de doser un élément, dans une solution, à condition de pouvoir l'isoler, sous forme pure (un précipité, par exemple), même avec un rendement, k, inférieur à 1.

Considérons un exemple précis : le dosage du baryum contenu dans une solution. Il faut disposer d'une solution, de concentration connue, de baryum radioactif. On réalise alors les opérations suivantes (fig. 21) :

– dans les deux récipients, on introduit la même masse, m_0, de baryum radioactif d'activité a_0 ;

– dans le récipient (2), on ajoute la solution à doser (10 cm³, par exemple), contenant une masse, m, de baryum ;

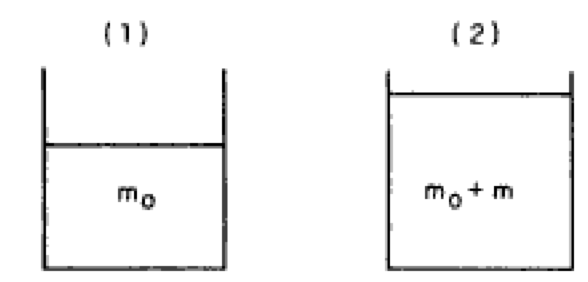


Fig. 21 Dilution isotopique.

– on traite alors les deux solutions dans les mêmes conditions. On obtient, dans les deux cas, une masse de précipité de sel de baryum, m, dont l'activité est a :

$$(1)\ \begin{cases} m_1 \\ a_1 \end{cases};\qquad (2)\ \begin{cases} m_2 \\ a_2 \end{cases}.$$

La connaissance de ces quatre nombres et celle de m_0 permettent de calculer m. Le rendement de précipitation, k, est le même dans les deux cas. Il affecte à la fois l'isotope radioactif et l'isotope non radioactif :

$$m_1 = k(m_0); \qquad m_2 = k(m_0 + m).$$

Le rendement k affecte donc, de la même façon, l'activité de la solution (proportionnelle à m_0). *Donc, les activités massiques ne sont pas modifiées par la précipitation.* On peut alors les calculer, avant et après cette opération :

– *avant* : $a'_1 = \dfrac{a_0}{m_0}$; $a'_2 = \dfrac{a_0}{m_0 + m}$

– *après* : $a'_1 = \dfrac{a_1}{m_1}$; $a'_2 = \dfrac{a_2}{m_2}$.

De ces deux relations, on tire :

$$m_0 . a'_1 = (m_0 + m)a'_2,$$

ou :

$$m = \frac{m_0(a'_1 - a'_2)}{a'_2}$$

donc :

$$\boxed{m = \frac{m_0 . \left(\frac{a_1}{m_1} - \frac{a_2}{m_2}\right)}{\left(\frac{a_2}{m_2}\right)}}$$

Remarques :

Si la dilution est importante, $\left(\frac{a_2}{m_2}\right)$ est négligeable devant $\left(\frac{a_1}{m_1}\right)$; par suite : $m \simeq m_0\left(\frac{a_1}{m_1} . \frac{m_2}{a_2}\right)$.

En sens opposé, il est possible de doser une faible quantité de substance marquée, en lui ajoutant une quantité connue de la même substance, mais inactive. C'est la *dilution isotopique inverse.*

4.2.3. RADIOIMMUNOLOGIE
(cf. chap. IV, 5)

Cette technique utilise la compétition entre un antigène marqué et un antigène non marqué, pour la réaction de formation d'un complexe avec l'anticorps correspondant.

4.2.4. APPLICATIONS EN HÉMATOLOGIE

Les explorations isotopiques ne sont pas beaucoup développées en hématologie. Les principales applications sont les suivantes :

– *détermination de la masse sanguine.* La méthode repose sur le principe de la dilution d'un traceur isotopique qui diffuse de façon homogène dans le volume sanguin. Elle permet de mesurer directement le volume érythrocytaire et le volume plasmatique, selon le marqueur utilisé :

- hématies marquées au ^{51}Cr ou ^{99}Tc ;
- albumine marquée à ^{131}I ou ^{125}I.

– *Étude de l'érythropoïèse* par le ^{59}Fe. Le renouvellement du fer dans l'organisme est avant tout destiné à la synthèse de l'hémoglobine. L'injection de ^{59}Fe lié à la sidérophiline permet donc de mesurer l'activité érythropoïétique efficace en suivant sa vitesse de disparition hors du plasma.

– *Mesure de la durée de vie des globules rouges* après marquage *in vitro* par ^{51}Cr.

– *Mesure du taux d'absorption de la vitamine* B_{12}.

– *Mesure de la durée de vie des plaquettes marquées au* ^{51}Cr.

4.2.5. UTILISATION EN RECHERCHE

L'utilisation fondamentale de traceurs est la recherche du métabolisme d'une substance, tant au point de vue de son métabolisme normal que pathologique. Il faut donc remplacer une molécule ordinaire par une molécule marquée. La substance marquée est administrée à une série d'animaux, à une dose bien précise ; il suffit ensuite de prélever des échantillons des différents tissus intéressants ou d'étudier la radioactivité directement en différents points de l'organisme.

L'exemple le plus classique est l'utilisation de *l'iode* comme marqueur de molécules. Parmi les 21 isotopes radioactifs de l'iode, l'iode ^{123}I présente les caractéristiques physiques les mieux adaptées à l'exploration *in vivo :* sa période est de 13,3 h, voisine de la période biologique de nombreux phénomènes ; il n'est pas émetteur β^- ; son rayonnement γ a une énergie de 159 keV, favorable à la pénétration, et donc à la détection *externe.*

On l'utilise pour l'exploration thyroïdienne et le marquage de molécules d'intérêt physiologique ; quelques cas de marquage simple peuvent se présenter :

– si la molécule possède déjà un atome d'iode, on utilise l'échange isotopique (cf. III.4, 4.3.2);

– le radioélément se substitue à un atome ou un groupement d'atomes appartenant à la molécule à marquer (substitution d'un H par un atome d'iode);

– le radioélément est fixé par addition, ou complexation (par exemple addition d'iode à l'acide oléique ou à une protéine).

On peut décrire l'obtention d'iode ^{123}I, à titre d'exemple, par une méthode indirecte. Une cible d'iode naturel est soumise à un flux de protons (60 MeV), obtenu par un cyclotron de haute énergie. Il se produit la réaction nucléaire :

$$^{127}I(p, 5n)^{123}Xe \xrightarrow[2,1\ h]{\beta^+} {}^{123}I.$$

Après irradiation, la cible est soit dissoute, soit chauffée et le xénon libéré est entraîné par balayage d'hélium. Puis, après passage sur un piège, à − 76 °C, les iodes formés sont piégés et recueillis dans une ampoule maintenue à basse température. Après quelques temps (7 h) le dernier piège est lavé avec du sérum physiologique qui dissout $^{123}I_2$.

4.3. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Les applications des traceurs sont basées sur le fait que les propriétés chimiques d'un atome sont indépendantes de la masse de celui-ci. Ceci n'est qu'une première approximation et la composition isotopique d'un élément influe souvent sur les propriétés physiques ou classiques : c'est *l'effet isotopique*.

En outre, l'étude chimique des substances radioactives porte souvent sur des quantités de matière très faibles dont l'activité doit être limitée par :

– les dangers physiologiques des radiations,

– le rayonnement lui-même, qui produit des effets chimiques de décomposition : c'est la *radiolyse*.

Une conséquence est que, sur des quantités faibles de substance, les effets d'absorption sur les parois, sur les phases solides, deviennent importants.

4.3.1. EFFETS ISOTOPIQUES

C'est l'étude de l'influence de la composition isotopique d'un élément sur ses propriétés physiques ou chimiques.

Une variation de composition isotopique d'un élément modifie, pour une molécule dans laquelle il se trouve :

– sa masse molaire (analyse isotopique au spectrographe de masse);

– les fréquences de vibrations (spectre infrarouge différent);

– les chaleurs massiques, les températures d'ébullition, etc.

Exemple :

D_2O ; TF = 3,8 °C ; T Eb = 101,4 °C.

La présence d'isotope peut modifier la cinétique des réactions ou les proportions des différentes espèces à l'équilibre (effet thermodynamique). Les constantes de vitesse sont d'autant plus différentes que la variation relative de masse atomique est plus élevée.

Exemples :

$^1_1H \quad ^2_1H \quad ^3_1H \quad \frac{k_1}{k_3} \sim 60 \qquad \frac{k_1}{k_2} \sim 15$

$^{12}_6C \quad ^{13}_6C \quad ^{14}_6C \quad \frac{k_{13}}{k_{12}} = 0,98 \qquad \frac{k_{14}}{k_{12}} \sim 0,96.$

Ces effets peuvent devenir importants,

essentiellement pour les atomes légers ; par exemple, l'eau lourde (^2H_2O) est un toxique pour la plupart des organismes vivants.

4.3.2. ÉCHANGES ISOTOPIQUES

C'est un phénomène important, qui intervient lorsque deux molécules contenant le même élément se trouvent en présence l'une de l'autre ; elles échangent entre elles l'élément commun. Cet échange chimique ne peut pas être mis en évidence en absence d'isotope radioactif. Le phénomène est lié de façon étroite à celui des effets isotopiques. On peut en donner un exemple.

Introduisons dans de l'alcool éthylique de l'iodure de méthyle ICH_3, ordinaire, avec de l'iodure de sodium Na I radioactif (^{131}I). Lorsqu'on isole l'iodure de méthyle, au bout d'un certain temps, on constate qu'il est devenu radioactif. Il a donc échangé des atomes d'iode avec l'iodure de sodium. Cet échange se traduit par l'équation :

$$ICH_3 + Na\,^{131}I \rightleftarrows \,^{131}ICH_3 + NaI.$$

L'échange isotopique peut se produire de différentes façons :

– *échange d'un électron*. Deux types d'ions d'un métal M sont placés en solution. Supposons que les ions M^{2+} soient radioactifs. Par échange d'un électron, les ions M^{3+} peuvent le devenir, par la réaction :

$$M^{2+*} + e^- \rightleftarrows M^{3+*}.$$

L'échange d'électrons est, en général, très rapide ; on obtient rapidement une proportion d'atomes radioactifs identique pour les deux types de cations ;

– *échange d'un atome*. Voici quelques exemples :

$$HCOOH + D_2O \rightleftarrows HCOOD + HDO$$

(c'est la liaison acide qui est échangée),

$$^*IO_3^- + I^- \rightleftarrows \,^*I^- + IO_3^-$$
$$H_2O + HD_{gaz} \rightleftarrows HDO + H_{2\,gaz}$$
$$^*NH_{3\,gaz} + NH^+_{4\,aq} \rightleftarrows \,^*NH^+_{4\,aq} + NH_{3\,gaz}$$

(la phase gazeuse, en général, s'enrichit en l'isotope le plus léger).

4.3.3. RADIOLYSE

C'est un phénomène de rupture de liaison chimique d'un atome dû au recul du noyau radioactif. Après rupture, les atomes produits sont capables d'existence dans un état chimique stable différent.

Une molécule organique contenant des halogènes radioactifs peut libérer des ions halogénures $^*ICH_3 \rightarrow \,^*I^-$.

Le permanganate de potassium $KMnO_4$ libère du dioxyde de manganèse.

Toutes ces réactions de rupture peuvent donc intervenir au niveau d'un traceur, s'il est utilisé avec une activité spécifique élevée. Inversement, ce phénomène permet d'obtenir des noyaux radioactifs de grande activité et de les séparer.

IV
MÉTHODES D'ANALYSE IMMUNOLOGIQUE

L'évolution de l'analyse immunologique est telle qu'il nous a paru indispensable d'introduire cette technique dans un ouvrage consacré à l'analyse biochimique.

La réaction antigène-anticorps était, et est toujours, utilisée pour le diagnostic immunologique : réactions de précipitation (précipitation en milieu liquide, en milieu gélifié), immunoélectrophorèse (cf. tome I, chap. II, II.4), réactions d'agglutination, de fixation du complément, de neutralisation, d'immunofluorescence. Mais certaines de ces méthodes ont été transposées à l'analyse semi-quantitative et quantitative : immunodiffusion radiale, immunofluorescence; de plus l'extrême spécificité de la réaction antigène-anticorps, a permis la mise au point de méthodes de dosage, la *radioimmunologie* et *l'immunoenzymologie*.

On peut signaler enfin, les méthodes immunobiochimiques de dosage de certaines protéines spécifiques du sérum basées sur une immunoprécipitation et une lecture du trouble causé par ce précipité au néphélomètre à laser.

Nous n'envisagerons dans le cadre de cet ouvrage que les applications de l'analyse immunologique aux dosages et renvoyons vers les ouvrages spécialisés pour l'analyse immunologique classique.

1. Généralités

1.1. ANTIGÈNES ET ANTICORPS

On appelle *antigène* toute substance qui, introduite dans un organisme, provoque *l'élaboration* d'anticorps et qui est *capable de réagir spécifiquement avec eux*.

Un antigène complet est immunogène.

Les *haptènes* sont des antigènes incomplets ; s'ils sont capables de se combiner spécifiquement à un anticorps, ils ne peuvent en déclencher l'élaboration. Ce sont généralement de petites molécules ; elles induisent la synthèse d'anticorps seulement lorsqu'elles sont couplées à une protéine.

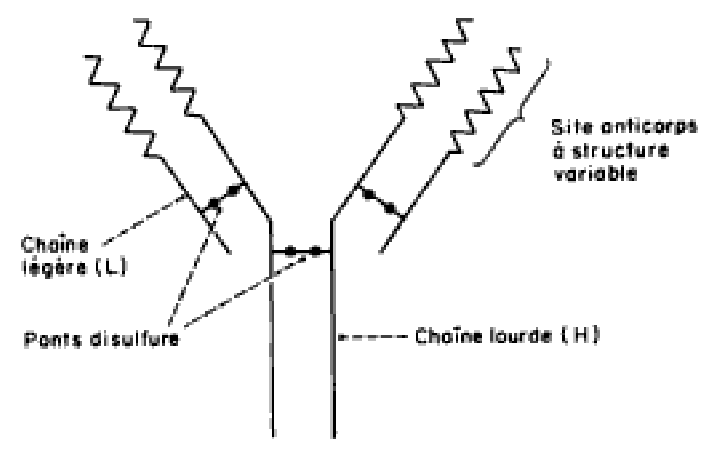
Un haptène, antigène incomplet, n'est pas immunogène.

On trouve parmi les substances antigéniques, les protéines, certains polyosides, des complexes lipoprotéiques et glycoprotéiques. Il est classique d'admettre qu'une substance est d'autant plus antigénique qu'elle a une masse moléculaire élevée. On fixe souvent à 5 000-10 000 Da la limite inférieure de la masse moléculaire d'une substance immunogène ; ainsi les protamines, polypeptides dont la masse moléculaire varie de 3 000 à 6 000 Da ne sont pas antigéniques.

Mais cette règle souffre des exceptions, ainsi la gélatine de masse moléculaire 80 000 Da est très faiblement immunogène, si bien que très longtemps on a pensé qu'elle était dépourvue de propriétés antigéniques, alors que l'ovalbumine de masse moléculaire 42 000 Da est un puissant antigène. Les antigènes peuvent être *libres*, c'est-à-dire dispersés dans un solvant aqueux ou *figurés*, donc liés à des cellules.

Les *anticorps* ou *immunoglobulines* sont des glycoprotéines élaborées par l'organisme à la suite de l'introduction d'un antigène étranger et capable de réagir spécifiquement avec lui.

On appelle **épitope** ou déterminant **antigénique** la parcelle de la surface de l'antigène qui se lie au site de fixation et de reconnaissance de l'anticops : le **paratope.**



1-*a*. Les chaînes H et L.

1.2. LES ANTICORPS

Traitée par le β mercaptoéthanol (agent chimique réduisant les ponts disulfure), une immunoglobuline G (IgG) se scinde en quatre chaînes :

– deux de masse moléculaire 51 000 Da chacune, on les appelle chaînes lourdes H (heavy) ;

– deux de masse moléculaire 22 000 Da chacune, on les appelle chaînes légères L (light).

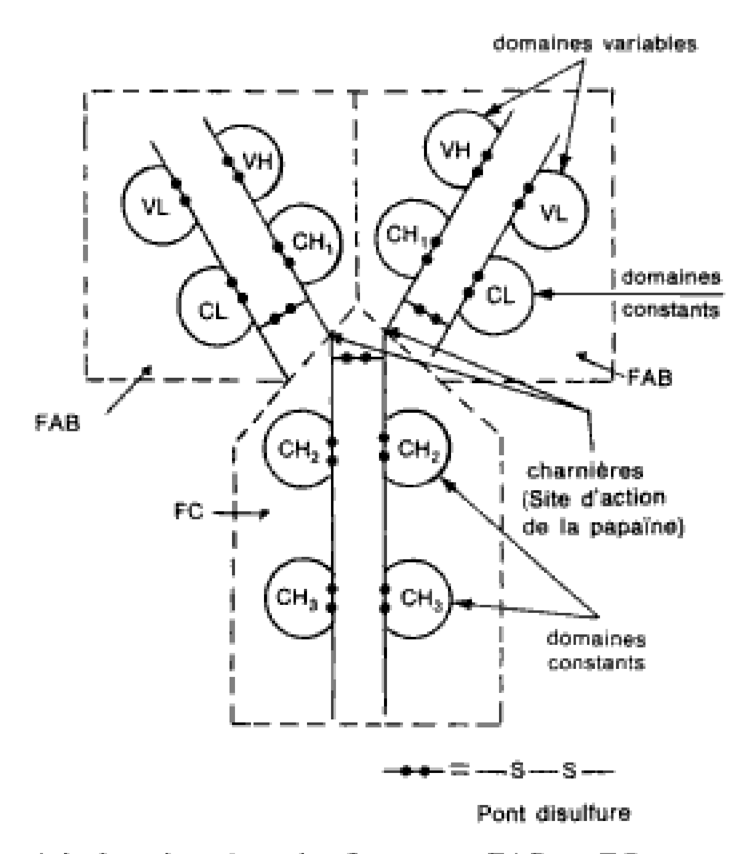
1.2.1. STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES

Toutes les immunoglobulines ont la même structure de base, elles sont formées de deux chaînes polypeptidiques lourdes (H) et de deux chaînes légères (L) associées par des ponts disulfure (fig. 1).

Les chaînes L sont constituées de deux domaines : un domaine variable VL et un domaine constant CL.

Les chaînes H sont généralement constituées de quatre domaines : un domaine variable VH et trois domaines constants CH_1, CH_2 et CH_3. Certaines chaînes H sont constituées de cinq domaines : un domaine variable VH et quatre domaines constants.

Traitée par la papaïne, enzyme protéolytique, dans des conditions définies et contrôlées, une immunoglobuline est coupée en trois fragments : deux fragments FAB (Fragment Antigen Binding) et un fragment FC (Fragment Crystallizable). Cette scission résulte de la coupure des deux chaînes H au niveau des charnières (Fig. 1*b*).



1-*b*. Les domaines, les fragments FAB et FC.

Fig. 1 Structure de base d'une immunoglobuline.

1.2.2. LES DIFFERENTES CLASSES D'ANTICORPS

Trois classes principales d'immunoglobulines ont été décrites : les IgG, les IgM et les IgA, ainsi que deux classes secondaires : les IgD et les IgE.

Il existe cinq types de chaînes lourdes H, définissant cinq classes d'immunoglobulines : les chaînes γ correspondent aux IgG, les chaînes μ aux IgM, les chaînes α aux IgA, les chaînes ε aux IgE et les chaînes δ aux IgD.

Il existe également deux types de chaînes légères L : κ (kappa) et λ (lambda) que l'on trouve indifféremment dans les cinq classes principales d'immunoglobulines.

A titre d'exemple, la formule générale d'une IgG s'écrira : γ_2L_2 ce qui correspond aux deux possibilités : γ_2K_2 ou $\gamma_2\lambda_2$.

1.2.1.1. Les IgG

Les IgG sont des glycoprotéines de masse moléculaire 146 000 à 170 000 Da de constante de sédimentation 7 S, constituées de deux chaînes γ et de deux chaînes courtes (κ ou λ).

Il existe quatre sous-classes d'IgG : IgG_1 ($\gamma_2^1L_2$), IgG_2 ($\gamma_2^2L_2$), IgG_3 ($\gamma_2^3L_2$) et IgG_4 ($\gamma_2^4L_2$).

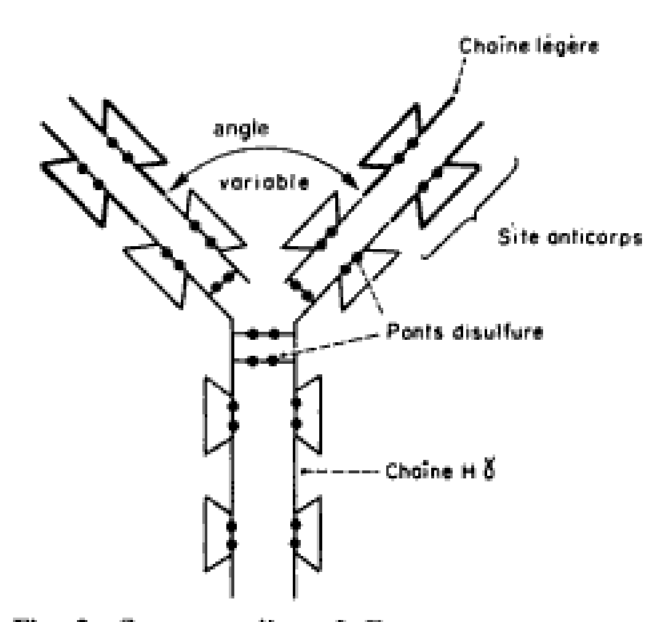


Fig. 2 Structure d'une IgG.

Une IgG comporte une vingtaine de ponts disulfure (le nombre varie selon la sous-classe d'IgG) (fig. 2).

Les IgG sont distribuées pour moitié dans les fluides intravasculaires (sang et lymphe circulante) et pour moitié dans des fluides extravasculaires (lymphe non circulante, liquide céphalorachidien, etc.). Les IgG représentent 70 à 90 p. 100 des immunoglobulines d'un sujet adulte. Leur rôle est fondamental dans les défenses de l'organisme contre l'infection ou les agressions toxiques.

1.2.1.2. Les IgM

Ce sont les premières immunoglobulines synthétisées au cours d'une réponse immunitaire.

Les IgM sont appelées *macroglobulines*. Ce sont des immunoglobulines de masse moléculaire 90 000 Da constituées de 5 sous-unités, soit 10 chaînes lourdes μ et 10 chaînes légères κ ou λ.

Les chaînes μ ont un domaine CH supplémentaire.

Les macroglobulines représentent 3 à 10 p. 100 des immunoglobulines d'un adulte. Elles témoignent d'un contact récent avec l'antigène, car, très vite élaborées, elles sont vite détruites (durée de demi-vie : 5 jours) (fig. 3).

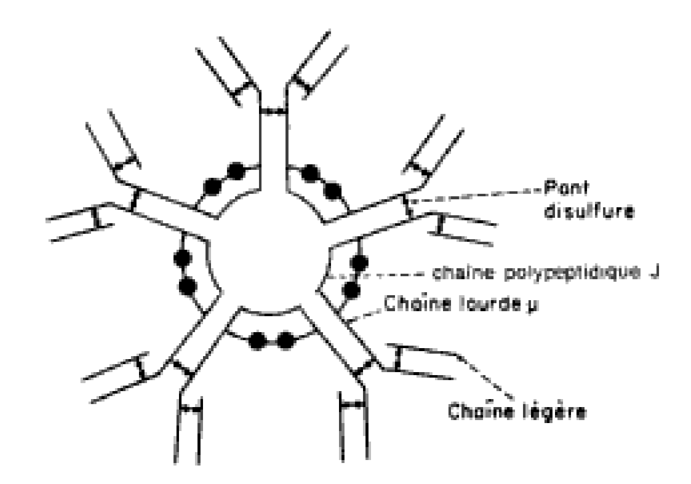


Fig. 3 Structure schématique d'une IgM.

1.2.1.3. Les IgA

Les IgA sont des immunoglobulines retrouvées dans le sérum (IgA sériques) et dans les sécrétions externes : sécrétions muqueuses, salive, larmes, sueur, colostrum (IgA sécrétoires).

Les **IgA sériques** ont une structure voisine de celle des IgG : les chaînes lourdes α ont une masse moléculaire de 56 000 Da, l'ensemble α_2L_2 a une masse moléculaire de 160 000 Da et une constante de sédimentation de 7 S.

Il existe deux sous-classes d'IgA : IgA_1 et IgA_2 (fig. 4).

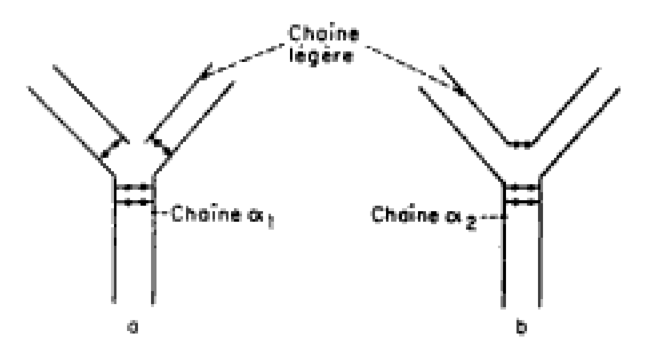


Fig. 4 Structure des IgA sériques. *a)* IgA_1. *b)* IgA_2.

Les **IgA sécrétoires** sont des dimères, deux IgA sont associés par une **pièce sécrétoire** : glycoprotéine de masse moléculaire égale à 70 000 Da et par une chaîne peptidique J semblable à celle qui existe dans les IgM (fig. 5).

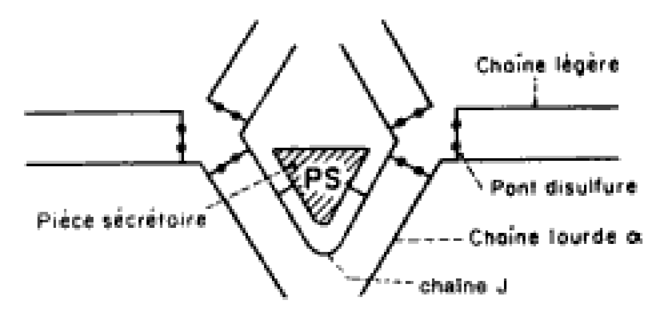


Fig. 5 Structure d'une IgA sécrétoire.

Les IgA sécrétoires représentent de 5 à 25 p. 100 des immunoglobulines chez un adulte ; elles jouent un rôle dans la défense des muqueuses. La fonction biologique des IgA sériques est peu connue.

1.2.1.4. Les IgD

Les IgD, constituées de deux chaînes δ (masse moléculaire 70 000 Da) et deux chaînes légères, ont une masse moléculaire de 180 000 Da et une constante de sédimentation égale à 7 S.

Ces immunoglobulines sont retrouvées dans le sérum à une très faible concentration, on les trouve également liées à la surface des lymphocytes B, sans que leur rôle soit parfaitement connu.

1.2.1.5. Les IgE

Les IgE sont formées de deux chaînes lourdes ε (masse moléculaire 75 000 Da et possé-

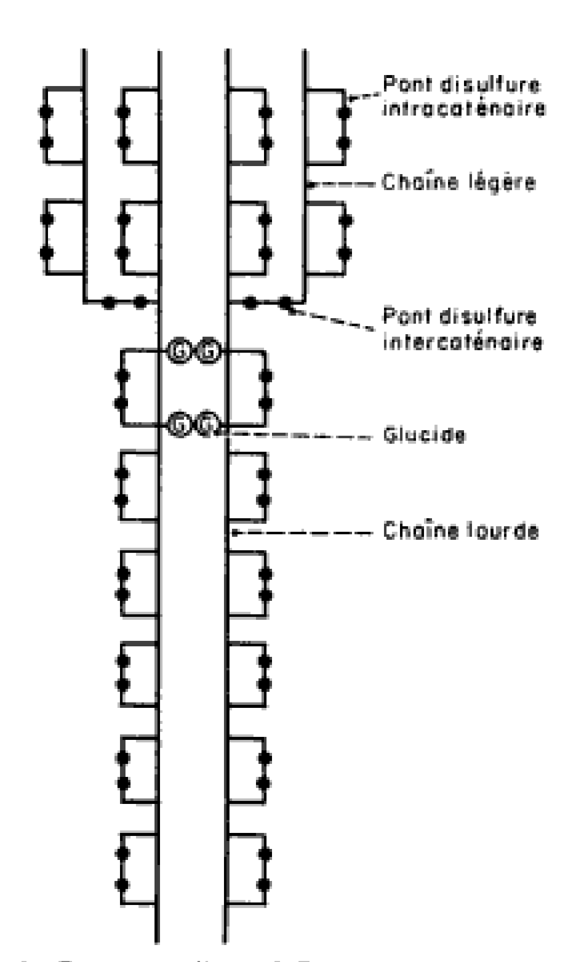


Fig. 6 Structure d'une IgE.

dant un domaine CH supplémentaire) et deux chaînes légères ; leur masse moléculaire est égale à 200 000 Da et leur constante de sédimentation est égale à 8 S (fig. 6).

Leur concentration est très faible dans le sérum, on les trouve liées aux membranes des mastocytes et des polynucléaires basophiles.

La stimulation des IgE liés aux mastocytes provoque une dégranulation de ces cellules avec libération brutale d'histamine. Le choc anaphylactique agit au niveau vasculaire en induisant une brusque hypotension.

Le rôle essentiel des IgE consiste en une protection contre les parasites de l'homme, principalement les vers parasitaires.

1.2.3. ANTICORPS POLYCLONAUX, ANTICORPS MONOCLONAUX

Lorsqu'un animal est immunisé par un antigène X, l'anticorps anti-X est formé par l'ensemble d'une grande diversité d'immunoglobulines, on parle alors d'**anticorps polyclonal.**

L'antigène X comporte généralement de nombreux épitopes ; si l'on prend comme exemple une protéine, chaque épitope est représenté par une portion de surface déterminée par une dizaine d'acides aminés. Chacun des déterminants antigéniques possède la potentialité d'activer une cellule productrice d'anticorps qui formera un clone.

La réponse à l'immunisation par un antigène X est donc l'élaboration de plusieurs immunoglobulines produites par une variété de cellules productrices d'anticorps.

Un **anticorps monoclonal** est représenté par une population homogène d'immunoglobulines, dérivant toutes d'une cellule productrice d'anticorps ; toutes ces molécules sont identiques et spécifiques d'un épitope donné.

La production d'anticorps monoclonaux est réalisé par des **hybridomes** (Köhler et Milstein) obtenus par la fusion d'un lymphocyte B de souris (en réalité, on utilise des leucocytes spléniques) producteur d'anticorps et d'une cellule cancéreuse, cellule de myélome de souris.

Les lymphocytes B producteurs d'anticorps ne cultivent pas sur milieu synthétique, les cellules myélomateuses cultivent. L'hybridome réalisé possède la propriété de produire un anticorps et de cultiver sur milieu synthétique.

On mélange des cellules spléniques de souris immunisée contre l'antigène X et des cellules de myélome de souris.

La fusion est obtenue par le polyéthylène glycol (PEG), les noyaux fusionnent et l'hybridome ainsi obtenu possède la faculté de fabriquer une immunoglobuline ainsi que l'immortalité de la cellule cancéreuse.

Il est nécessaire de sélectionner les hybridomes après la fusion ; on opère par culture sur milieu sélectif. A cet effet, on utilise des cellules myélomateuses mutantes $HPRT^-$ (hypoxanthine phosphoribosyl transférase$^-$), ces cellules, incapables d'utiliser l'hypoxanthine ne peuvent cultiver en présence d'aminoptérine qui inhibe l'utilisation des purines intrinsèques.

Sachant que les lymphocytes B, bien que $HPRT^+$ ne cultivent pas non plus, seuls cultiveront les hybridomes obtenus par fusion entre un lymphocyte B $HPRT^+$ et une cellule de myélome $HPRT^-$. Le milieu sélectif utilisé est le milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine), l'aminoptérine est l'agent sélectif, l'hypoxanthine et la thymidine servent de sources de purines.

La dernière étape est le clonage des hybridomes sécrétant une immunoglobuline spécifique d'un antigène donné (fig. 7).

La production d'anticorps monoclonal (ACM) est obtenue en injectant l'hybridome dans le péritoine d'une souris, l'ACM est purifié à partir du liquide d'ascite recueilli.

On s'oriente maintenant vers une culture in vitro.

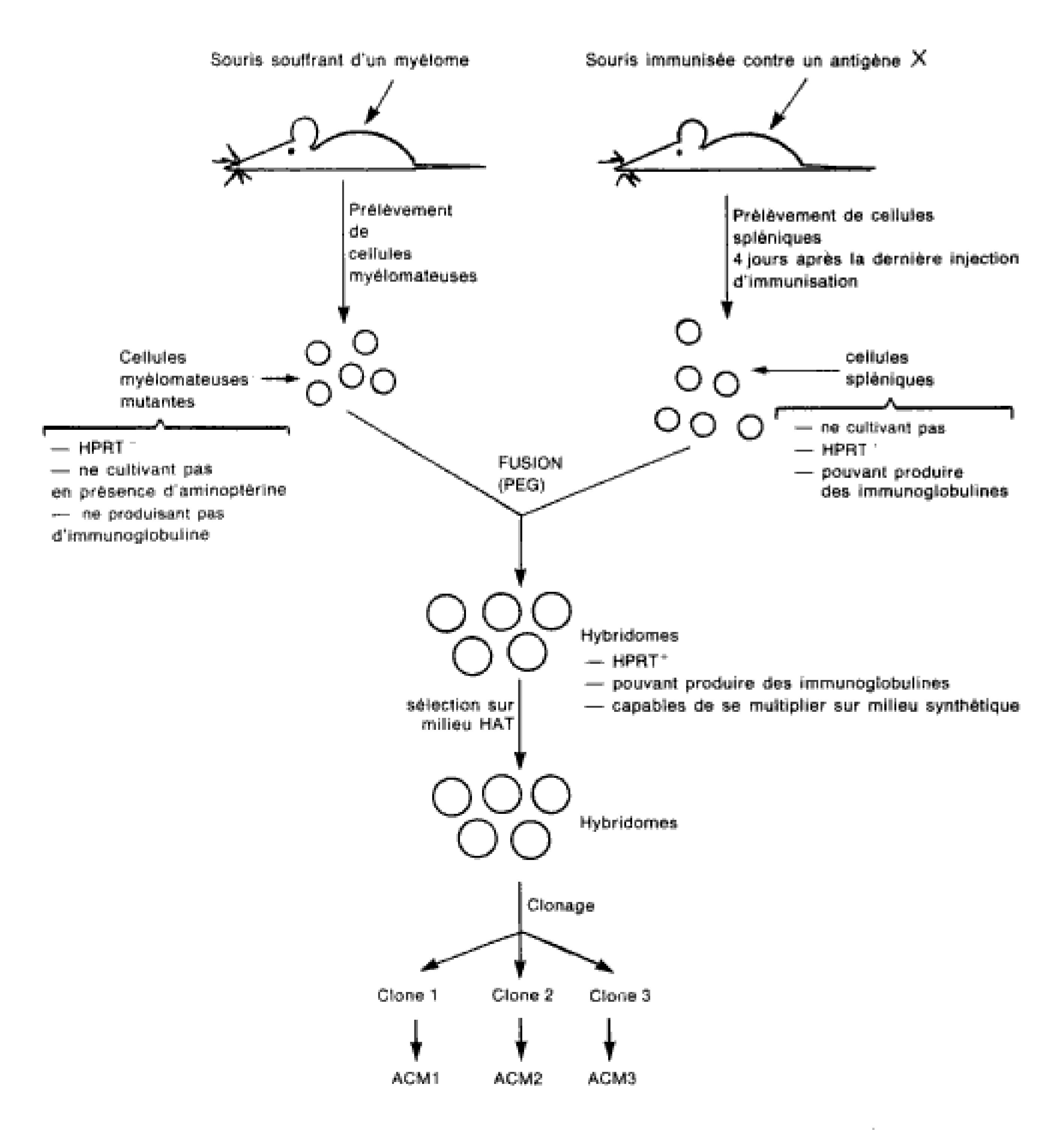


Fig. 7 Représentation de la procédure de fabrication des anticorps monoclonaux.

1.3. LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

L'association antigène-anticorps est un phénomène *spécifique ;* les molécules, après rencontre, établissent des liaisons *non covalentes et non spécifiques*. La spécificité est donc le seul fait de l'étroite complémentarité de structure des sites réactifs de l'antigène et de l'anticorps.

Les meilleurs anticorps sont ceux qui ont la plus grande complémentarité avec l'antigène. Un anticorps peut néanmoins établir des liaisons avec deux épitopes dissemblables mais ayant cependant des parentés de structure (fig. 8).

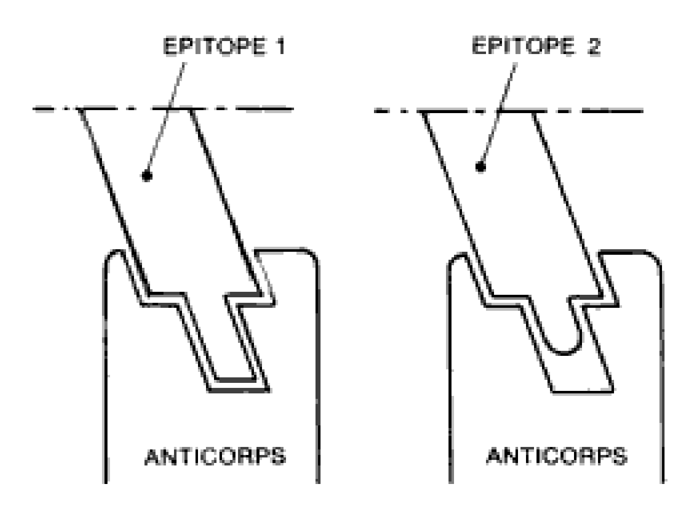


Fig. 8 Interactions entre un anticorps et deux déterminants antigéniques.

La réaction antigène-anticorps se manifeste par :

– une *précipitation*, dans le cas d'un antigène soluble,

– une *agglutination*, si l'antigène est particulaire,

– une *lyse*, pour certaines cellules : hématies ou bactéries en présence de complément.

Une réaction *haptène-antihaptène* peut être non précipitante, elle doit alors être mise en évidence autrement.

1.3.1. LE MÉCANISME DE LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

La formation d'un complexe antigène-anticorps peut être assimilée à un équilibre chimique :

$$Ag + Ac \rightleftarrows Ag - Ac,$$

$$Keq = \frac{(Ag - Ac)}{(Ag)(Ac)}.$$

Cette réaction, simplifiée, ne tient pas compte des différents sites de fixations de l'antigène et de l'anticorps.

La constante d'équilibre Keq, représente la constante d'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Cette constante peut être déterminée par une dialyse à l'équilibre et la représentation de Scatchard dans le cas d'un haptène (cette technique sortant du cadre de cet ouvrage, nous renvoyons les lecteurs intéressés vers des ouvrages spécialisés en immunologie générale ou enzymologie). La constante Keq dépend pour un couple antigène-anticorps :

– du pH (qui modifie l'état ionique des groupements dissociables de l'antigène et de l'anticorps) ;

– de la température ;

– de la force ionique du milieu.

Les liaisons qui assurent l'association entre l'antigène et l'anticorps sont des liaisons secondaires, faibles (ce qui explique la réversibilité de la réaction). Ce sont des liaisons :

– ioniques : ion-ion ;

– hydrogène : dipôle-ion ; ou dipôle-dipôle ;

– de Van der Walls : entre dipôles non permanents ;

– hydrophobes.

On explique les réactions de précipitation ou d'agglutination par l'existence d'un réseau cohérent : les anticorps généralement bivalents et les antigènes polyvalents se groupent en un édifice réticulé (fig. 9).

Antigène

Anticorps

Fig. 9 Représentation schématique d'un réseau antigène-anticorps.

Les anticorps bloquants sont ceux qui empêchent la formation du réseau, ils sont soit univalents, soit trop petits.

L'insolubilité du complexe antigène-anticorps est expliquée, d'une part par les dimensions du réseau et d'autre part par la loi de l'occlusion (les fonctions qui assuraient la solubilité de l'antigène et l'anticorps sont masquées par la formation du complexe).

Si les antigènes et anticorps sont solubles, cela est dû au fait que ces macromolécules établissent des liaisons électrostatiques avec l'eau solvant.

La formation du complexe antigène-anticorps masque certains des groupements polaires des deux partenaires, les molécules désolvatées précipitent.

1.3.2. LES PROPORTIONS ANTIGÈNE-ANTICORPS

La stœchiométrie de la réaction antigène-anticorps joue un rôle important dans la formation du réseau. Un excès d'antigène ou un excès d'anticorps empêche la formation de l'anticorps.

Envisageons à titre d'exemple le cas théorique d'un antigène et d'un anticorps divalents. Le rapport sœchiométrique $\frac{(Ag)}{(Ac)}$ est égal à 1 (fig. 10*a*, *b*, *c*).

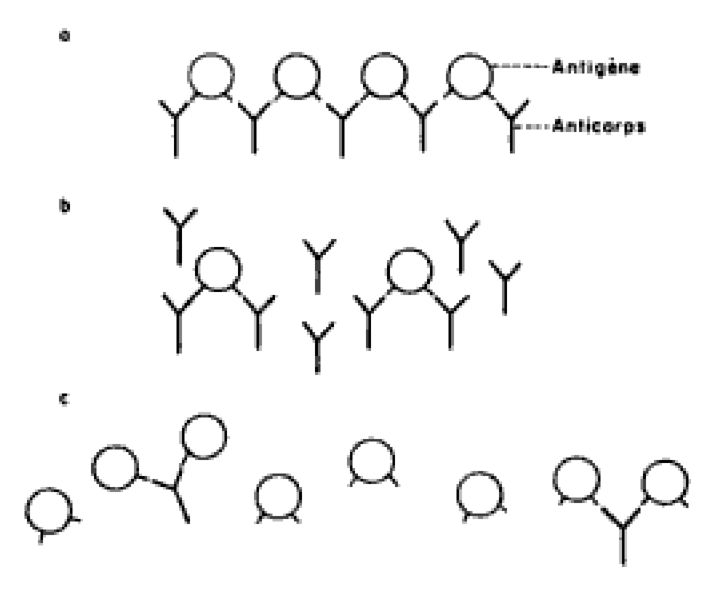


Fig. 10 Relation entre les rapports (Ag)/(Ac) et la formation du réseau. *a*) Rapport stœchiométrique d'équivalence : formation d'un réseau. *b*) Excès d'anticorps : pas de réseau. *c*) Excès d'antigène : pas de réseau.

La courbe de la figure 11 représente les variations de la quantité de précipité, en fonction du rapport antigène-anticorps.

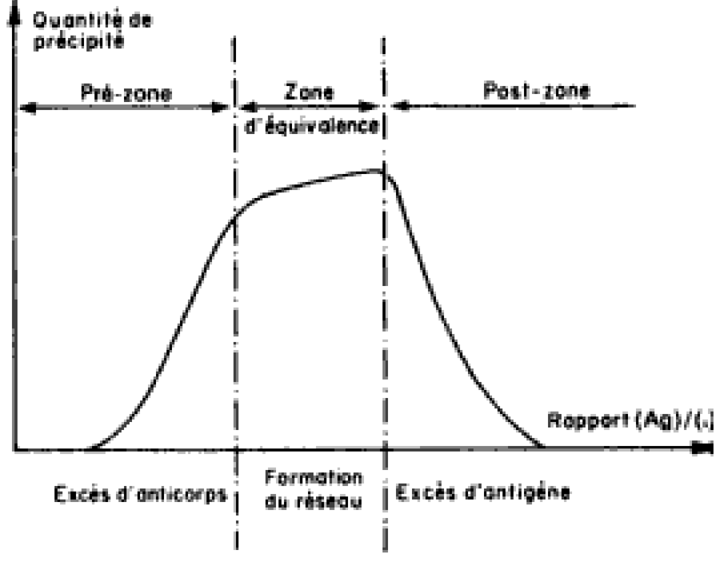


Fig. 11 Courbe de variation de la quantité de précipité en fonction du rapport Ag/AC.

Ces lignes peuvent être observées à la loupe éclairante, ou photographiées, ou colorées, après lavage des protéines non précipitées à l'eau physiologique. Cette technique est semi-quantitative. En effet on peut comparer l'épaisseur et la position de la ligne de précipitation obtenue, dans des conditions expérimentales absolument identiques avec l'antigène échantillon et avec un antigène étalon. Un arc épais et plus éloigné du puits de l'antigène indique que la concentration de ce dernier est augmentée (cf. fig. 12) et inversement.

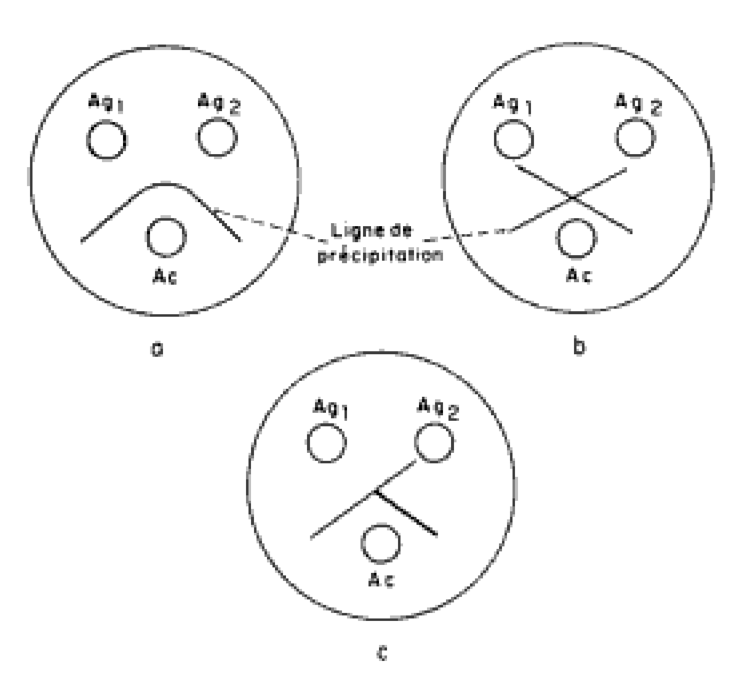


Fig. 13 Interprétation qualitative de la technique d'Ouchterlony. *a)* La parfaite coalescence des deux lignes indique l'identité immunologique des deux antigènes. *b)* Les lignes de précipitation se croisent. Il n'y a aucune parenté immunologique entre les deux antigènes. *c)* Un éperon indique des antigènes partiellement identiques.

2.3. IMMUNODIFFUSION RADIALE

Le dosage par immunodiffusion radiale est surtout appliqué aux protéines sériques humaines. Il est basé sur la diffusion et l'immunoprécipitation en gel d'agar tamponné. Le gel d'agar, contenant un anticorps spécifique dans sa masse est coulé, dans des conditions opératoires bien précises sur une lame de verre.

Des puits sont découpés : dans l'un on introduit un volume constant du sérum analysé, dans l'autre un sérum étalon, titré en antigène.

Au cours de la diffusion, l'antigène forme, avec l'anticorps correspondant, un anneau de précipitation dont le diamètre varie avec la concentration (fig. 14).

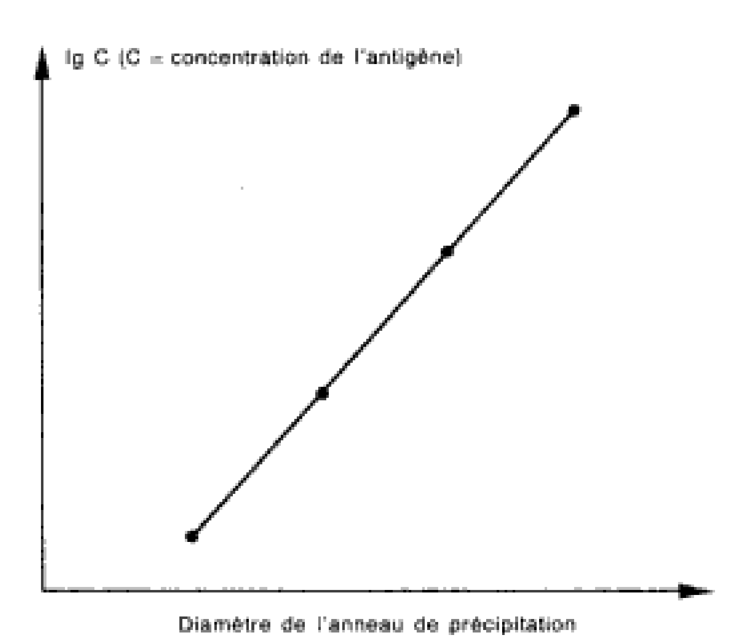


Fig. 14 Le logarithme de la concentration de l'antigène est proportionnel au diamètre de l'anneau de précipitation.

3. L'immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique permettant de visualiser par fluorescence un complexe antigène particulaire-anticorps. Ses applications sont multiples en virologie, bactériologie et parasitologie.

Il existe maintenant des méthodes de dosage, basées sur le principe de l'immunofluorescence, permettant la détermination de certaines immunoglobulines antiparasitaires (toxoplasme par exemple).

3.1. PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

L'immunofluorescence consiste a visualiser un complexe antigène-anticorps à l'aide d'une immunoglobuline rendue fluorescente à l'aide d'un fluorochrome colorant fluorescent, comme l'isothiocyanate de fluorescéine, qui se fixe sur l'immunoglobuline sans en modifier les caractères immunologiques.

On parlera *d'immunofluorescence directe* lorsque l'antigène, incubé avec l'anticorps fluorescent, forme un complexe antigène-anticorps fluorescent (fig. 15).

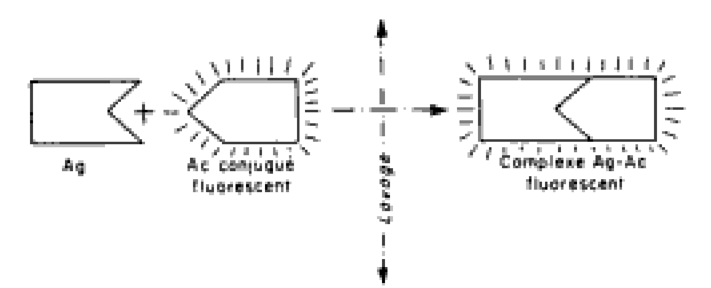


Fig. 15 Immunofluorescence directe.

On parlera d'*immunofluorescence indirecte* lorsque l'anticorps fluorescent n'est pas spécifique de l'antigène mais d'une immunoglobuline anti-antigène (fig. 16).

Ainsi utilise-t-on des anticorps lapin (ou chèvre) fluorescents spécifiques des IgG ou IgM humaines.

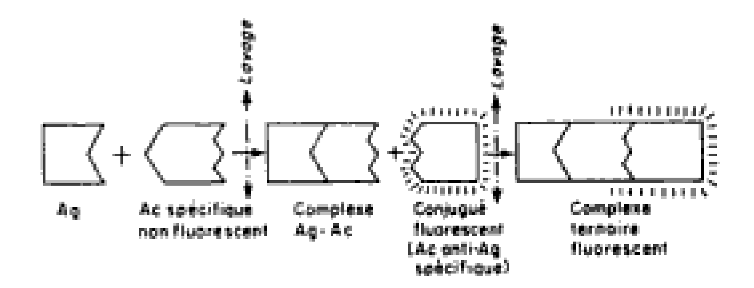


Fig. 16 Immunofluorescence indirecte.

Le principe physique de cette visualisation est celui de la fluorescence. Un microscope pour examens en fluorescence comporte outre l'optique classique d'un microscope pour fond clair :

– une source, lampe à vapeur de mercure ou lampe à halogène ;

– un filtre d'excitation, qui sélectionne la radiation d'excitation ;

– un filtre d'arrêt, qui sélectionne la lumière réémise.

On distingue, les microscopes pour *épifluorescence* lorsque la préparation est excitée par un rayonnement réfléchi, des microscopes avec excitation en *lumière transmise*.

Les microscopes pour épifluorescence (fig. 17) sont plus utilisés que ceux pour excitation par lumière transmise, les pertes d'énergie lumineuse sont plus faibles et leur utilisation ne nécessite pas de chambre noire. Le faisceau émis par la source est focalisé et centré, est réfléchi sur la préparation par une lame dichroïque (le rayonnement d'excitation traverse l'objectif, ce qui oblige le constructeur à monter un objectif ayant une excellente transmission dans le proche UV) et excite la préparation. La lumière fluorescée traverse la lame dichroïque et l'objet fluorescent est observé dans l'oculaire.

Les microscopes pour fluorescence par transmission (fig. 18) éclairent la préparation par un faisceau de lumière monochromatique transmis. L'objet fluorescent est observé dans l'oculaire, après que la lumière émise a traversé un filtre d'arrêt.

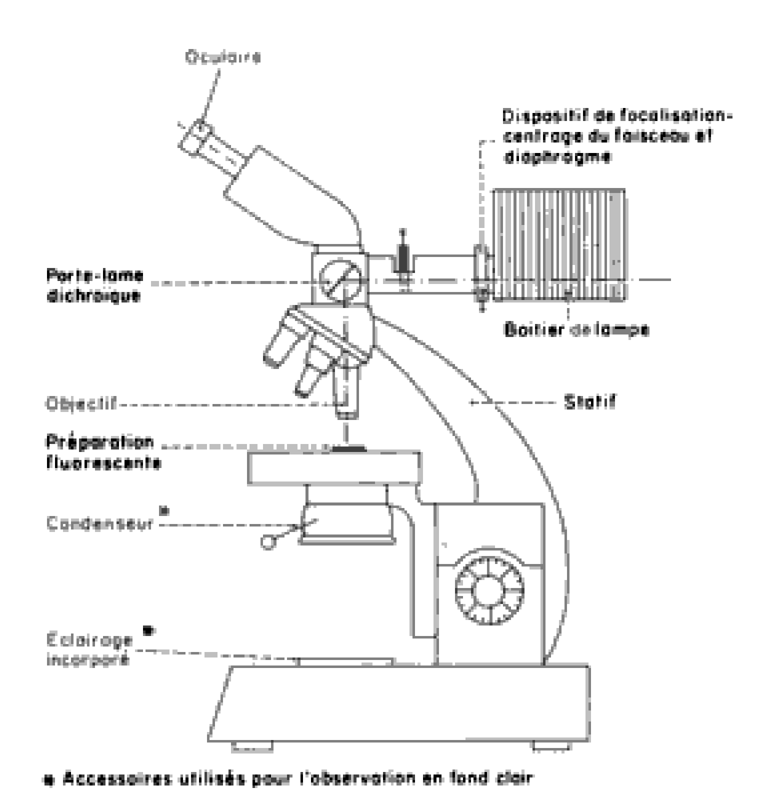


Fig. 17 Schéma d'un microscope pour épifluorescence. Le condenseur et l'éclairage incorporé ne sont utilisés que pour l'observation en transmission.

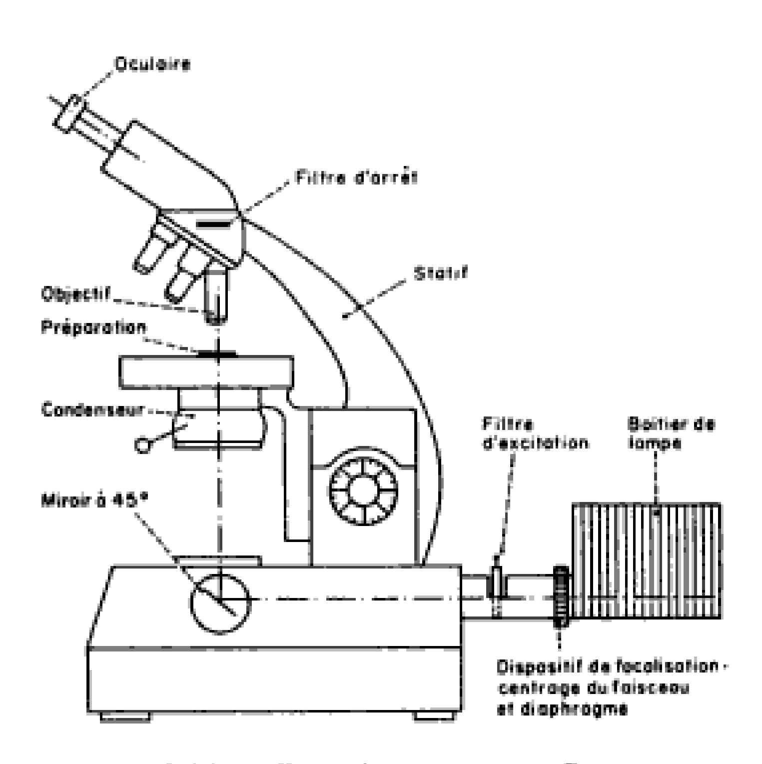


Fig. 18 Schéma d'un microscope pour fluorescence par transmission.

3.2. PRINCIPE SOMMAIRE DU TITRAGE DES IgG ET IgM ANTITOXOPLASMIQUES DANS UN SÉRUM HUMAIN

On met en présence l'antigène toxoplasmique et le sérum à tester. On lave les préparations, puis on révèle les anticorps fixés sur l'antigène par un sérum antiglobuline (anti IgM ou anti IgG) marqué à la fluorescéine. Les préparations sont colorées au bleu Évans, afin de faciliter la lecture. Ce colorant masque l'autofluorescence des toxoplasmes et des éléments cellulaires en leur conférant une fluorescence rouge sombre. Seuls les toxoplasmes présentant une fluorescence jaune-vert indiquent une réaction positive (fig. 19*a* et 19*b*).

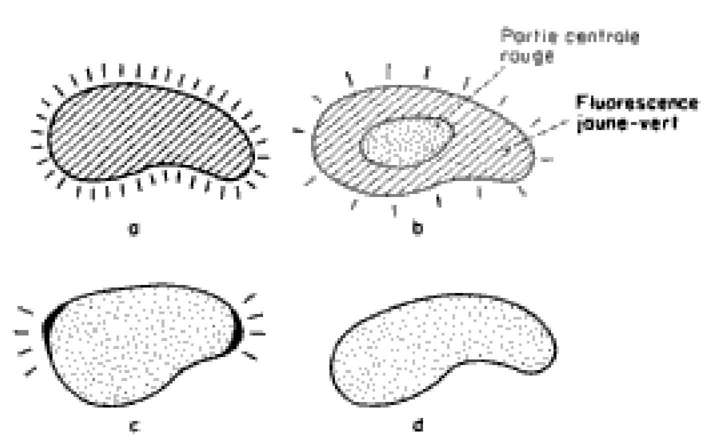


Fig. 1 Lecture des IF de toxoplasmes. *a*) Réaction fortement positive : le parasite présente une vive fluorescence jaune-vert, sans coloration rouge. *b*) Réaction faiblement positive : fluorescence jaune-vert périphérique, partie centrale rouge. *c*) Réaction négative : fluorescence polaire. *d*) Réaction fortement négative : absence totale de fluorescence.

Un témoin réalisé avec le conjugué fluorescent seul et un témoin réalisé avec un sérum sans anticorps doivent être négatifs. L'étude quantitative du sérodiagnostic de la toxoplasmose est réalisée en effectuant une série de

dilutions successives du sérum à analyser : 1/20, 1/200, 1/400, 1/800, ... 1/12 800. Le titre du sérum est donné par la plus grande dilution dont la réaction est positive : fluorescence périphérique franche du toxoplasme (fig. 19*b*). Au préalable, il est nécessaire de titrer le conjugué fluorescent sur un sérum étalon positif.

4. Le dosage spécifique des protéines par immunoprécipitation (immunonéphélémétrie)

Cette technique immunochimique nécessite un matériel plus complexe que pour l'immunodiffusion radiale, mais elle est plus rapide et plus précise.

Le dosage des protéines par immunoprécipitation est basé sur la mesure du trouble causé par la réaction entre l'antigène à titrer et un anticorps correspondant. La concentration en anticorps étant constante, la teneur du complexe Ag – Ac ne dépend que de la concentration de la protéine antigénique.

La mesure du trouble est faite par néphélémétrie à laser. On peut opérer en méthode « point final », qui consiste à mesurer l'intensité maximale du trouble ou en méthode « cinétique » qui consiste à mesurer sa vitesse d'apparition. Cette technique est appliquée au dosage des immunoglobulines sériques. Ses avantages sont évidents : précision, spécificité et rapidité ; il faut être absolument certain de la rigoureuse pureté de l'anticorps.

5. Les dosages radio-immunologiques et enzymo-immunologiques

Cette partie de l'immunochimie s'applique aux dosages d'un certain nombre de substances naturelles ou médicamenteuses : hormones, protéines, vitamines, drogues, etc.

Le principe de ces dosages est fondé sur :

– la réaction entre un anticorps et deux antigènes identiques (l'un d'eux est marqué, l'autre est à doser),

ou

– la réaction entre un antigène et deux anticorps dont l'un est marqué.

Il existe des dosages immunochimiques basés sur la compétition entre deux antigènes pour un même anticorps, avec et sans déplacement, il existe également des dosages immunochimiques sans compétition.

Dans la technique radio-immunologique (RIA), l'antigène est marqué par un élément radioactif ; dans les techniques enzymo-immunologiques (ELISA), l'antigène ou l'anticorps est conjugué à une enzyme qui sert de signal indicateur.

5.1. PRINCIPE DES DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES PAR COMPÉTITION AVEC DÉPLACEMENT ET SÉPARATION

Soit Ag l'antigène ou l'haptène à doser, Ag* l'antigène identique marqué, Ac l'anticorps, on réalise le premier équilibre :

$$Ag^* + Ac \rightleftharpoons Ac - Ag^*.$$

Au complexe Ac – Ag*, on ajoute une prise d'essai de l'échantillon à doser contenant l'antigène Ag. Ce dernier déplace l'antigène marqué Ag* des sites anticorps :

$$Ag + Ac - Ag^* \rightleftharpoons Ac - Ag + Ag^*.$$

La proportion, entre complexes marqué et non marqué, dépend des concentrations des deux antigènes; si les quantités d'antigène marqué et d'anticorps sont fixes, elle ne dépendra que de la quantité d'antigène Ag à doser.

La mesure du déplacement de l'équilibre nécessite la séparation des antigènes libres et complexés.

De nombreuses méthodes ont été étudiées, l'une d'entre elles semble, par sa simplicité, l'emporter : c'est la méthode qui consiste à fixer l'anticorps sur un solide : granules de Sephadex ou de polyacrylamide, paroi du tube de la réaction, billes de verre.

5.1.1. ÉTUDE DU DÉPLACEMENT DE L'ANTIGÈNE MARQUÉ Ag* PAR L'ANTIGÈNE A DOSER Ag

On supposera que l'antigène marqué et l'anticorps sont en concentrations fixes, l'addition de quantités croissantes d'antigène non marqué entraîne la baisse du taux en Ag* lié à l'anticorps. Si l'on représente la variation

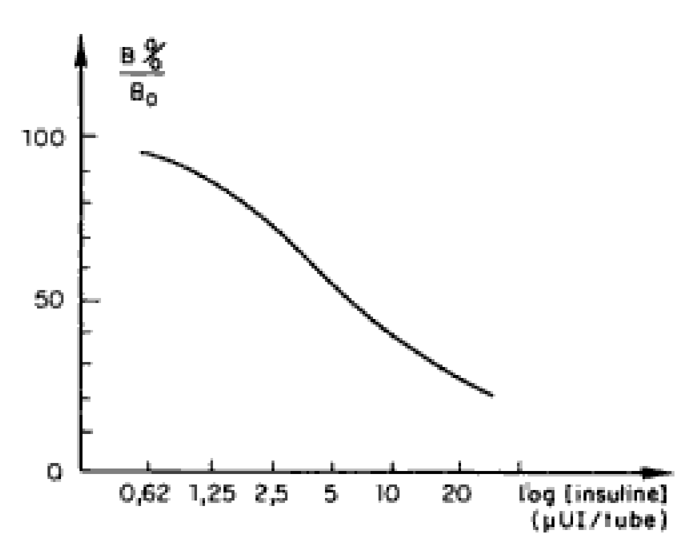


Fig. 20 Courbe d'étalonnage d'un dosage d'insuline par radio-immunologie.

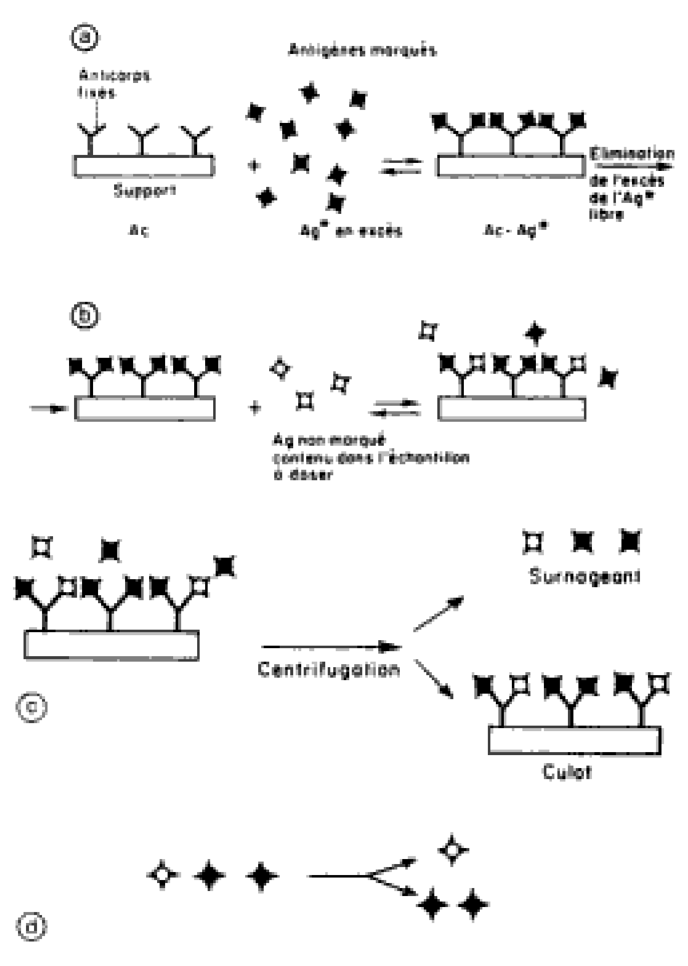


Fig. 21 Principe général d'un dosage immunochimique. *a*) Formation du complexe Ac-Ag*. *b*) Déplacement de l'Ag* par l'Ag à doser. *c*) Séparation des antigènes liés et des antigènes libres. *d*) Dosage des antigènes marqués Ag* déplacés.

V

ANALYSE AUTOMATIQUE EN BIOCHIMIE

Les analyseurs automatiques sont présents dans tous les laboratoires d'analyse médicale ; on les trouve aussi dans certains laboratoires industriels et dans certains secteurs de contrôle de l'environnement. Ils accomplissent toutes les opérations d'une manipulation d'analyse biochimique après avoir enchaîné leur déroulement.

Le quasi-totalité des automates est pilotée par un ordinateur qui gère les échantillons, les procédures d'analyse et les résultats.

Un automate analytique de biochimie est **monoparamétrique** ou **multiparamétrique** selon qu'il dose un paramètre de l'échantillon ou plusieurs ; il est **sélectif** ou **non sélectif :** un appareil sélectif n'effectue sur un échantillon que les dosages qui ont été programmés, un appareil non sélectif multiparamétrique effectue toutes les analyses sur chacun des échantillons ; l'automate travaille **analyse par analyse** ou **échantillon par échantillon ;** dans le premier cas, il exécute l'analyse d'un paramètre sur tous les échantillons pour lesquels cette analyse est programmée, puis il passe à l'analyse d'un autre paramètre ; dans le second cas, il effectue toutes les analyses programmées sur un échantillon, lorsque ces analyses sont terminées, il passe au suivant, et ainsi de suite.

L'appareil qui travaille analyse par analyse est plus rapide, la limitation des rinçages économise du temps ; en revanche, avec ce type d'automate, on ne peut faire le secrétariat qu'en fin de série, ce qui n'est pas le cas de l'automate qui travaille échantillon par échantillon, où le secrétariat est fait au fur et à mesure ; de plus il est aisé d'introduire une urgence dans une série, mais la multiplication des rinçages ralentit la cadence d'analyse.

1. Les deux principes fondamentaux de l'analyse automatique en biochimie

Le premier principe sur lequel repose l'analyse automatique est l'**univariance** du système : tous les échantillons sont soumis à des procédures analytiques identiques, la seule variable est la **concentration.**

Le second est **l'analyse constamment relative :** les échantillons sont traités dans les mêmes conditions que des étalons appelés **calibrateurs,** la concentration des premiers est déduite de celle des seconds.

2. Les différentes opérations d'une analyse automatique

Les opérations d'un dosage biochimique se résument aux interventions suivantes :

– prise d'essai de l'échantillon ;

– éventuelle purification de l'échantillon : déprotéinisation, défécation, filtration, centrifugation ;

– addition de réactifs en proportions définies ;

– mélange du milieu réactionnel ;

– incubation ;

– mesure ;

– calcul et secrétariat.

2.1. OPÉRATION DE PRISE D'ESSAI D'ÉCHANTILLON

L'échantillon – un sérum de patient, le plus souvent, en laboratoire d'analyses médicales – est prélevé puis déposé dans un godet à réaction ou injecté dans une veine liquide en flux continu.

Le passeur d'échantillons (fig. 1) comporte un dispositif contenant les échantillons et un mécanisme de pipettage. Les échantillons, disposés dans des godets, sont répartis sur un plateau d'échantillonnage ou un portoir mobile ou encore sur une chenille formée de modules assemblés comme un jeu de construction et animée d'un mouvement linéaire de déplacement.

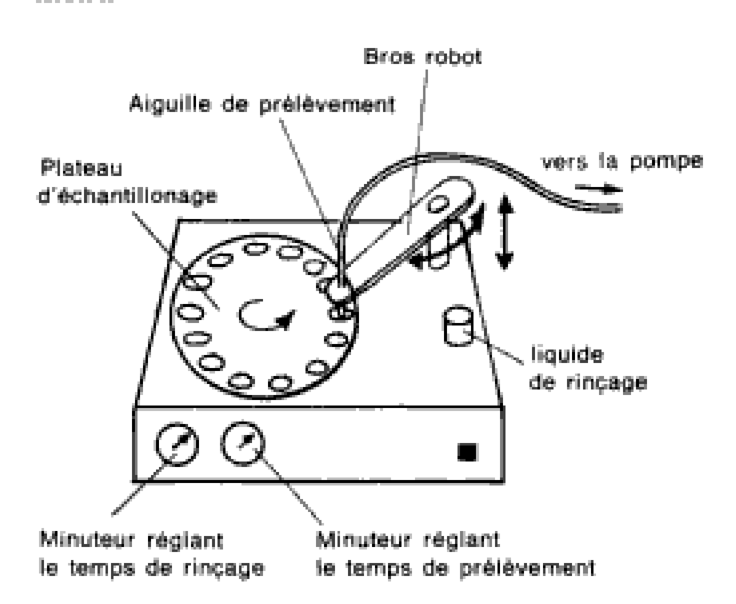


Fig. 1a Passeur d'échantillon d'une chaîne de flux continu de 1[re] génération. L'aiguille aspire l'échantillon, puis le prélèvement effectué ; le bras robot se relève, puis, d'un mouvement de rotation, amène l'aiguille au-dessus du bac à liquide de rinçage et s'abaisse.

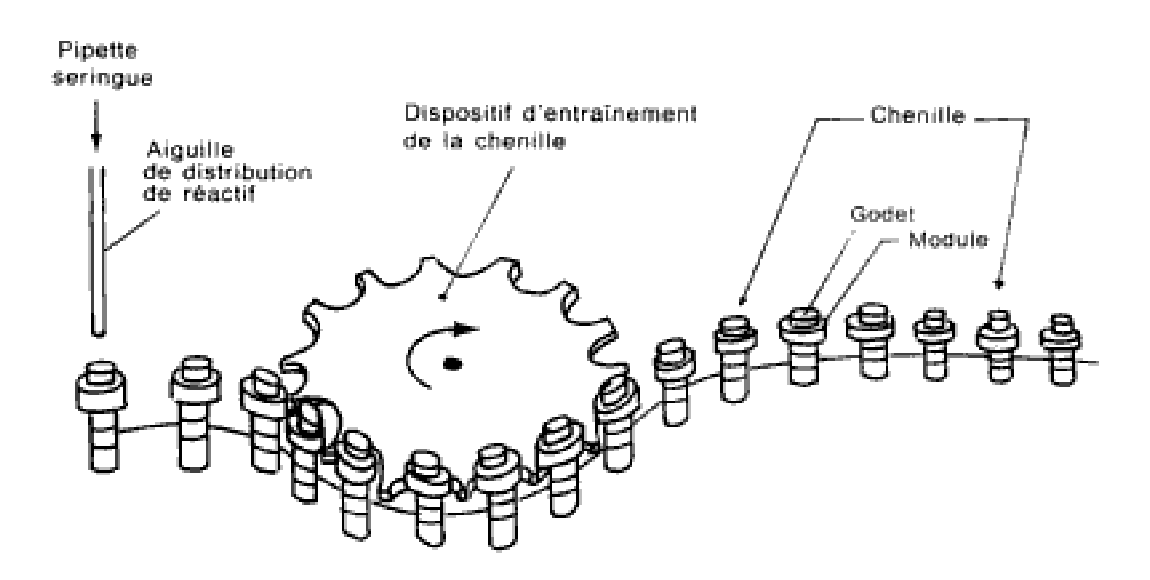


Fig. 1b Passeur d'échantillon à chenille d'un appareil de transfert.

Le mécanisme de prélèvement comporte deux parties :

– un bras robot porteur d'une aiguille de prélèvement qui sert à pipetter des volumes d'échantillons ;

– un dispositif d'aspiration constitué d'une pompe péristaltique ou d'une seringue.

2.2. PURIFICATION DE L'ÉCHANTILLON

Cette opération, très rarement exécutée sur les automates analytiques de biochimie, est effectuée par dialyse sur les analyseurs en flux continu.

La description d'un dialyseur est faite paragraphe 3.1.5. (p. 133).

2.3. ADDITION DES RÉACTIFS

Dans la majeure partie des cas, les réactifs utilisés sont liquides ; des exemples d'analyseurs de chimie sèche seront décrits ultérieurement cependant.

Sur les appareils à flux continu, l'addition des réactifs est faite au niveau des pièces de raccordement, veine liquide et réactif étant propulsés par la même pompe péristaltique (p. 132).

Sur les appareils de transfert, deux types de mécanisme peuvent assurer l'addition des réactifs :

– dans l'un, les godets sont fixes, un bras robot se dirige vers le flacon à réactif, y plonge l'aiguille d'aspiration, prélève un volume donné de réactif grâce à une seringue puis se relève et va déverser le réactif dans le godet ; enfin il procède à un rinçage du dispositif ;

– dans l'autre, le poste de distribution, constitué d'un réservoir à réactif, d'une seringue et d'une aiguille est fixe et le godet se déplace pour venir sous le poste de distribution.

2.4. HOMOGÉNÉISATION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL

Cette opération indispensable est assurée par différents procédés.

Dans les appareils à flux continu, le mélange est obtenu par une bobine de mélange (fig. 2) ; tout segment liquide qui parcourt une spire est culbuté sur lui-même, s'il parcourt une bobine de 10 tours, cela équivaut à 10 agitations.

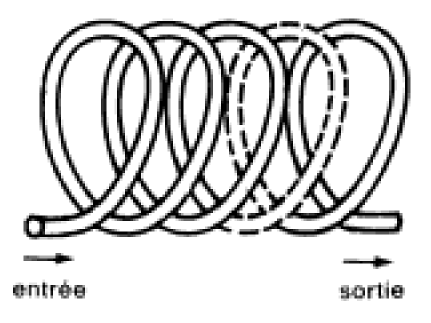


Fig. 2 Bobine de mélange.

Les dispositifs d'homogénéisation des appareils de transfert sont nombreux : insufflation de bulles d'air, agitation mécanique du godet par un entraînement mécanique ou une turbine à air, agitation magnétique, etc.

2.5. INCUBATION

L'incubation est l'opération qui consiste à maintenir le mélange réactionnel à une température constante et exacte : θ °C pendant une durée fixe de *t* minutes. Il existe différents types d'incubateurs :

– le bain liquide thermostaté,
– le four à air,
– le module thermostaté par effet Pelletier.

2.6. MESURE

La mesure est toujours fondée sur une méthode physique, potentiométrique ou optique.

Dans la majeure partie des cas, c'est une mesure photométrique, visible ou UV. Certains automates analytiques de biochimie prennent la mesure dans une cuve à circulation (appareils à flux continu) ; d'autres dans le godet à réaction, celui-ci devant avoir les qualités optiques requises ; d'autres, enfin, effectuent la mesure dans une cuve après transfert du milieu réactionnel ; cette opération est suivie d'une vidange et d'un rinçage.

2.7. ACQUISITION ET TRAITEMENT DES MESURES

Ces fonctions sont assurées par la partie informatique de l'appareil qui a en charge la gestion des résultats de l'analyse, c'est-à-dire l'acquisition de la mesure après transformation du signal analogique en signal numérique, puis les calculs, enfin le secrétariat et l'archivage des résultats.

3. L'analyse en flux continu

Mise au point par la société Technicon en 1950, cette technique est ainsi dénommée car les réactions s'effectuent dans un courant de liquide bullé et animé d'un mouvement continu.

3.1. CHAÎNE DE 1re GÉNÉRATION

Un autoanalyseur est une chaîne de modules reliés entre eux, chaque élément assurant une fonction analytique définie.

La veine liquide dans laquelle s'effectuent les réactions passe d'un module à l'autre par un tube en plastique souple.

3.1.1. LA VEINE LIQUIDE

La veine liquide est créée au niveau des deux premiers modules de la chaîne : distributeur d'échantillons et pompe péristaltique (fig. 4).

L'ordre d'introduction de l'air et de l'échantillon dans le diluant est toujours celui décrit sur la figure 4.

Le *diluant*, qui est le flux vecteur, sert de solvant pour l'échantillon (eau ou eau physiologique), de liquide de lavage, ou quelquefois de réactif.

Les *bulles d'air* sont introduites pour segmenter la veine liquide. L'air assure trois fonctions :

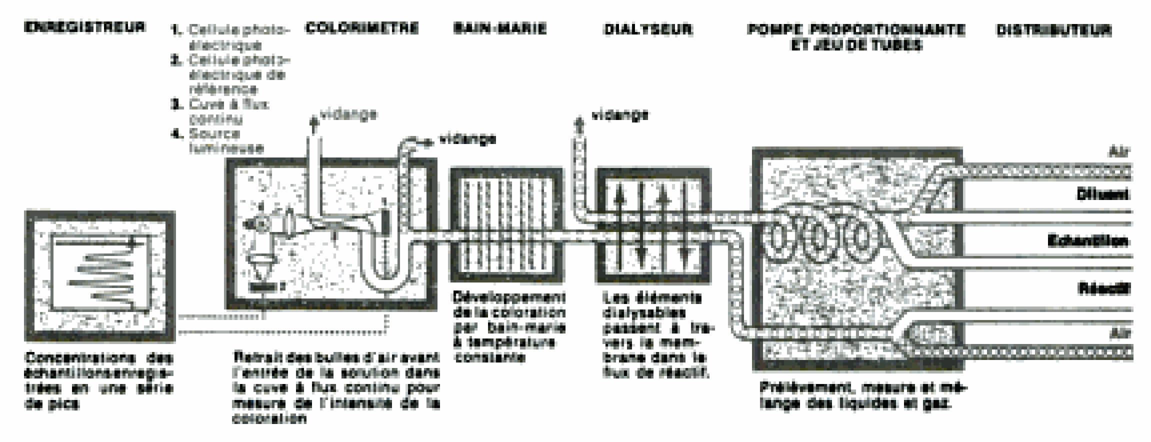


Fig. 3 **Schéma d'ensemble d'un auto-analyseur 1re génération. (Document Technicon;** reproduction autorisée).

Tube de transfert
Echantillon (n)
Aiguille d'aspiration
Godet
Milieu à analyser (n)
Air
Eau de rinçage
Eau
Eau
Air
Echantillon (n+1)
Milieu à analyser (n+1)
1 2 3 4 5
Echantillon (n+1) Air Eau Air Echantillon n
Barrière anti-contamination

Fig. 6 Séparation des échantillons au niveau des prélèvements.
1 : Aspiration du nième échantillon.
2 : La pipette se relève au-dessus du godet et aspire un segment d'air.
3 : La pipette plonge dans le réservoir et aspire l'eau de rinçage.
4 : La pipette sort du réservoir et aspire un segment d'air.
5 : La pipette plonge dans le godet suivant et aspire le (n + 1) ième échantillon.

Le choix des durées d'aspiration et de rinçage conditionne, comme cela a été vu antérieurement, la cadence d'analyse, mais aussi le tracé des enregistrements (fig. 7).

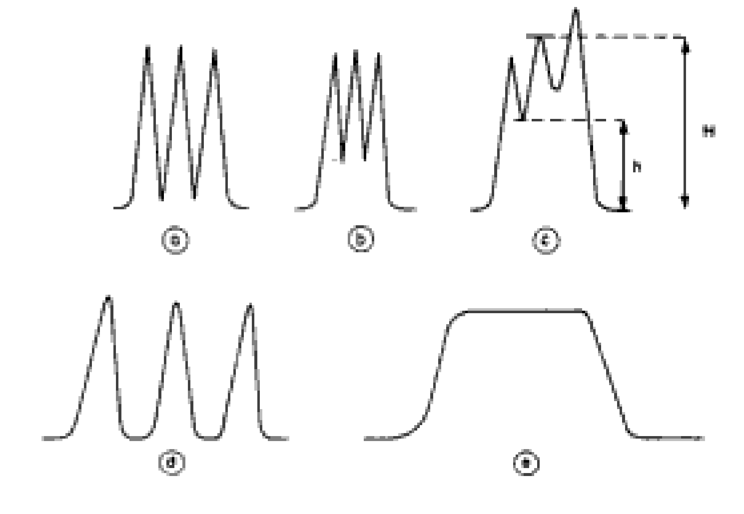


Fig. 7 Tracés d'enregistrement normaux et anormaux. *a*) Durée de rinçage correcte. *b*) Contamination légère tolérée (il n'y a pas retour à la ligne zéro). *c*) Forte contamination $\left(h \geqslant \frac{H}{Z}\right)$: il faut augmenter la durée du rinçage. *d*) Durée de rinçage trop importante. *e*) Échantillon trop important : réduire la durée de prélèvement.

conséquent leurs débits, sont connus d'après un code de couleur (tableau I). C'est du rapport des débits des tubes de pompe que dépend la proportion des volumes délivrés de chacun des réactifs. Pour que tous les tubes soient obturés, il faut que l'épaisseur de chacun d'eux soit fixe, égale à *e* (fig. 9).

On peut monter un assez grand nombre de tubes sur un corps de pompe, d'une dizaine à une trentaine selon les modèles. Quel que soit le fabricant, les pompes d'autoanalyseurs tournent toutes à la même vitesse.

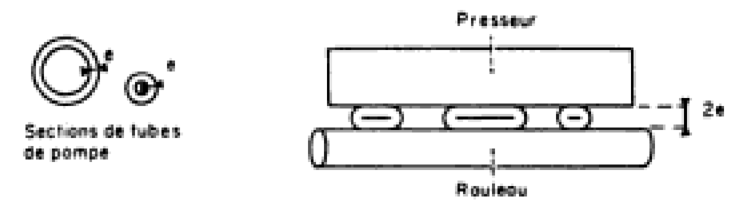
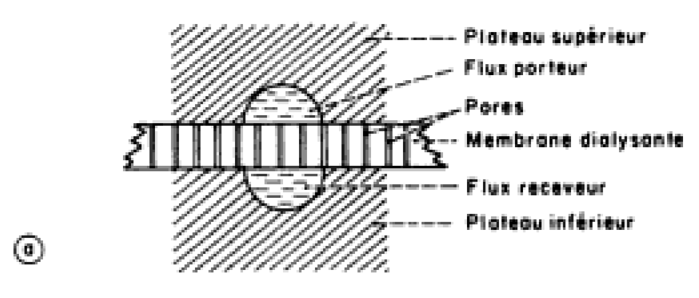


Fig. 9 Détails des tubes de pompe en place.



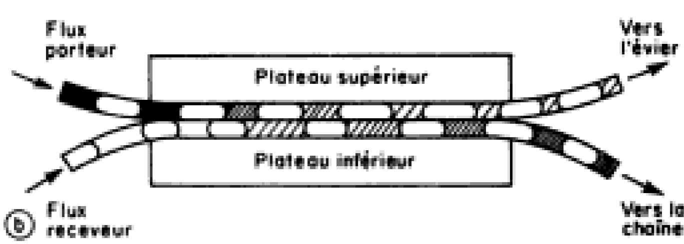


Fig. 10 Principe de la dialyse. *a*) Détails de la membrane. *b*) Circulation des flux porteurs et receveurs.

3.1.4. LES BOBINES

Les bobines (fig. 2) sont des serpentins de verre, comportant de 5 à 30 tours pour les bobines simples ; il en existe par ailleurs des doubles et des triples.

Les bobines jouent un triple rôle :

– les *bobines de mélange :* chacune des spires culbute les segments liquides sur eux-mêmes.

– les *bobines de délai :* utilisées lorsque la réaction est longue, pour assurer un temps de contact suffisant entre les réactifs et l'échantillon ; les bobines de bain-marie sont des bobines de délai ;

– les *bobines de refroidissement :* en sortie de bain-marie, les bulles d'air sont dilatées, après le transit dans la bobine de refroidissement, elles reprennent leur dimension initiale.

3.1.5. LE DIALYSEUR

Ce module, qui n'est pas nécessaire pour tous les dosages, assure la déprotéinisation de l'échantillon par dialyse.

La veine liquide passe sur une membrane semi-perméable, les petites particules diffusent (ions, urée, glucose, etc.) (fig. 10).

De l'autre côté de la membrane, circule un liquide bullé, appelé *liquide de contre-dialyse*. Le dialyseur est constitué de deux plateaux, creusés chacun d'un demi-sillon et séparés par une membrane dialysante (fig. 10).

Les deux liquides circulent dans le *même sens* et au *même débit*.

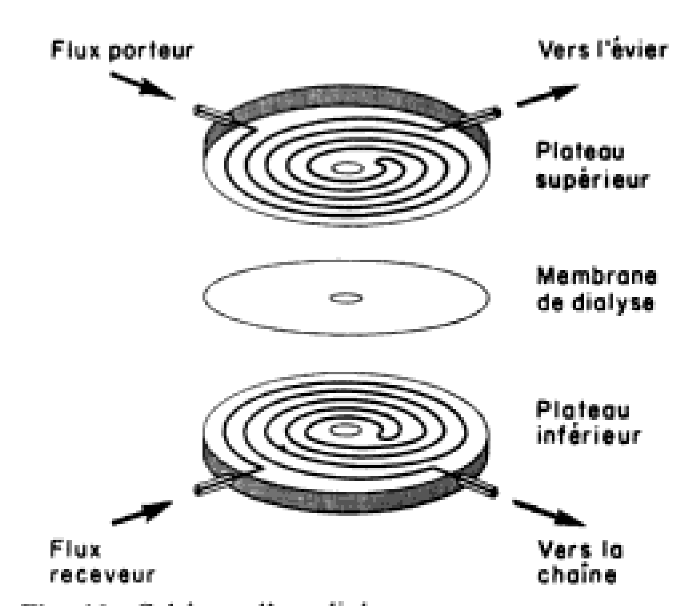


Fig. 11 Schéma d'un dialyseur.

– les « *nipples* » sont des pièces plastiques servant également à raccorder des tubes entre eux (fig. 14) ;

– les *pièces de verre* servent à raccorder entre eux plusieurs courants liquidiens ou gazeux (fig. 15) ;

– les anti-retours servent à atténuer « l'effet de recul » des pompes péristaltiques, ils sont montés le plus souvent sur le tube de pompe de l'air. La plupart du temps, ce sont des tubes de faible diamètre, mais il existe des modèles d'anti-retour moins simples.

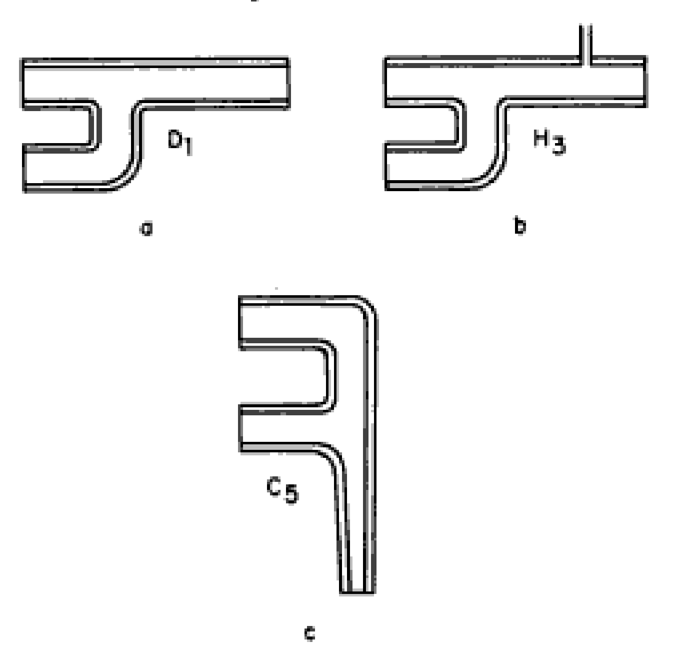


Fig. 15 Pièces de verre. *a)* Servant à réunir deux veines liquides. *b)* Servant à raccorder l'échantillon sur le flux vecteur bullé (injecteur). *c)* Servant au débullage.

3.2. ANALYSE DANS LES CONDITIONS DE L'ÉTAT CONSTANT : ANALYSE CONSTAMMENT RELATIVE

La réaction a lieu dans les mêmes conditions pour tous les échantillons : durée, température, rapport identique des volumes délivrés, facteur de dialyse constant, etc. La seule variable est donc la concentration de l'échantillon. L'enregistreur trace la courbe de la figure 16 lorsque le volume de l'échantillon est important.

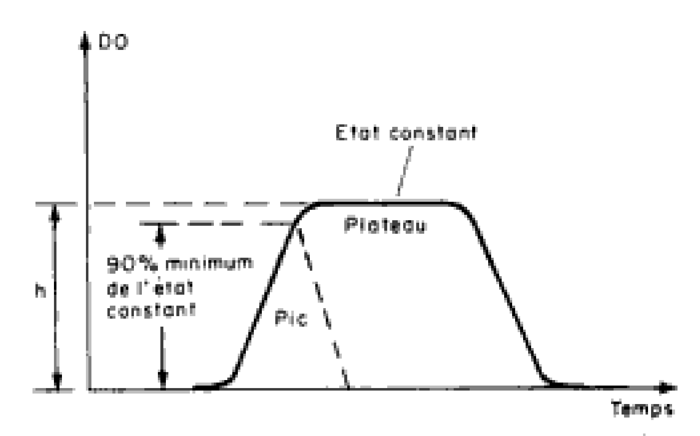


Fig. 16 Mesure de l'absorbance dans les conditions de l'état constant.

Dans ces conditions, la *hauteur h est proportionnelle à la concentration*. Pour augmenter la cadence d'analyse, on diminue la durée d'aspiration de l'échantillon et l'on transforme le plateau en pic, à condition que la hauteur de ce dernier soit au minimum égale à 90 p. 100 de celle du plateau. *La hauteur des pics est donc proportionnelle à la concentration*. C'est la comparaison des hauteurs de pics qui permettra le calcul des concentrations.

L'analyse des *constamment relative*, car la méthode est basée sur la comparaison entre étalons et échantillons à doser.

3.3. MONTAGE D'UNE CHAÎNE

3.3.1. LE MANIFOLD (fig. 17)

C'est l'ensemble des tuyaux, raccords et pièces de verrerie d'une chaîne d'analyse automatique.

3.3.2. RÈGLES DE MONTAGE D'UN MANIFOLD

Le manifold doit comporter le minimum de pièces : tuyaux, raccords, etc. Tous les raccords,

avoir un débit égal à 60-70 p. 100 du flux liquide total.

- **Exemple de manifold : détermination de la glycémie par la méthode à l'orthotoluidine**

Le mode opératoire de la méthode manuelle est le suivant :

– ***Déprotéinisation :***

Dans un tube à centrifuger conique, verser :
– 0,2 cm^3 de sang,
– 1 cm^3 d'eau distillée,
– 1 cm^3 d'ATCA à 60 g/l.

Agiter, laisser reposer 5 minutes. Centrifuger à grande vitesse pendant 10 minutes.

Si l'on opère sur du plasma, la déprotéinisation n'est pas nécessaire.

– ***Réaction colorée :***

Dans un tube bouchant émeri, verser :
– 0,5 cm^3 de liquide surnageant,
– 4,5 cm^3 de réactif à l'orthotoluidine.

Boucher, mélanger.

Porter au bain-marie bouillant pendant 8 minutes exactement.

Refroidir ensuite en plongeant le tube dans un bain d'eau froide.

Lire l'absorbance à 630 nm au bout de 10 minutes.

– ***Manifold :***

On peut supprimer la déprotéinisation, puisque l'on n'opère pas sur sang total.

Le flux porteur principal est le réactif à l'orthotoluidine (fig. 19).

La conception de ce manifold est faite en mettant en place d'abord le tube de pompe du réactif à l'orthotoluidine : on choisit le tube violet-blanc de débit 3,90 $cm^3.min^{-1}$. Le tube d'air correspondant devant avoir un débit de $\frac{3,90}{3} = 1,30\ cm^3.min^{-1}$, on choisit le tube jaune-jaune dont le débit est le plus proche, 1,20 $cm^3.min^{-1}$.

Le volume de sérum ajouté à 4,5 cm^3 de réactif à l'orthotoluidine est, dans la méthode

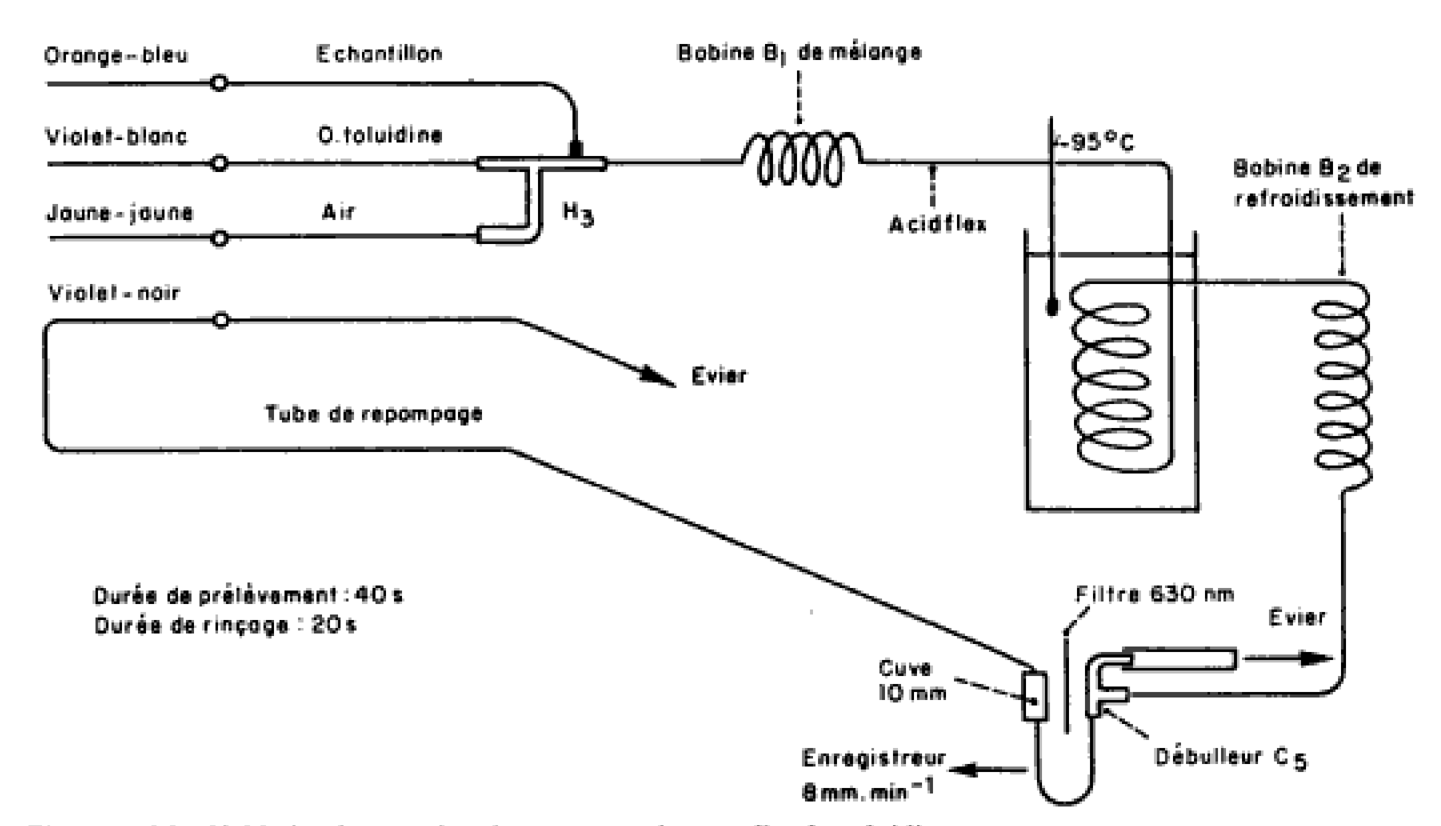


Fig. 19 Manifold du dosage du glucose sanguin par l'orthotoluidine.

manuelle, égal à $\frac{0,2 \times 0,5}{2,2} = 0,045\ cm^3$.

3,90 cm^3 étant assez proche de 4,5 cm^3, on choisira le tube de 0,05 $cm^3.min^{-1}$ de débit, soit le tube orange-bleu.

Le tube de repompage doit avoir un débit de 60 à 70 p. 100 du débit liquide total, soit

$$\frac{(3,9 + 0,05) \times 70}{100}, \quad \text{soit} \quad 2,76\ cm^3.min^{-1}.$$

On choisit le tube violet-noir dont le débit de 2,90 $cm^3.min^{-1}$ est le plus proche.

• La contamination

Lorsqu'un échantillon laisse dans le tube de transfert des traces de substances, il contamine l'échantillon qui le suit.

Le **contrôle** de la contamination est fait :

– par observation de la forme des pics : entre deux pics, une vallée trop haute est le signe d'une contamination, elle est intolérable si la hauteur de la vallée est supérieure à la moitié de la hauteur du pic (fig. 20*a*) ;

– par un essai de répétabilité (fig. 20*b*) : on passe trois fois le même échantillon à la suite, les pics doivent avoir les mêmes hauteurs, les hauteurs des vallées ne doivent pas excéder la limite de tolérance.

– par la mesure du temps $T_{1/2}$ (fig. 21) : on prélève une solution ou un sérum étalon en augmentant la durée du prélèvement, l'enregistreur trace un plateau. On appelle temps $T_{1/2}$ le temps nécessaire pour atteindre la moitié de la hauteur du plateau. Le temps $T_{1/2}$ doit être inférieur au tiers de la période, soit le temps séparant le prélèvement de deux échantillons successifs.

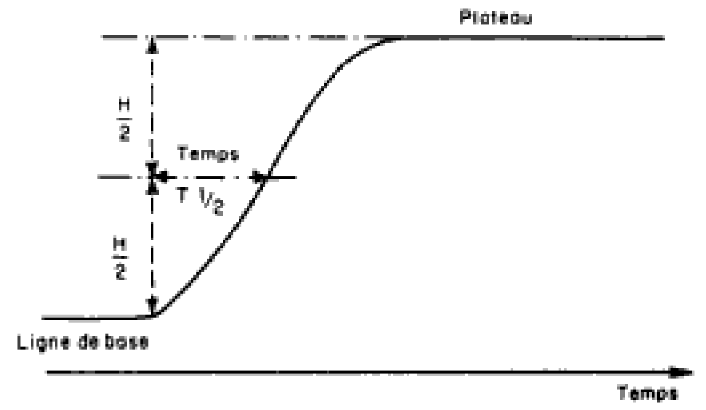
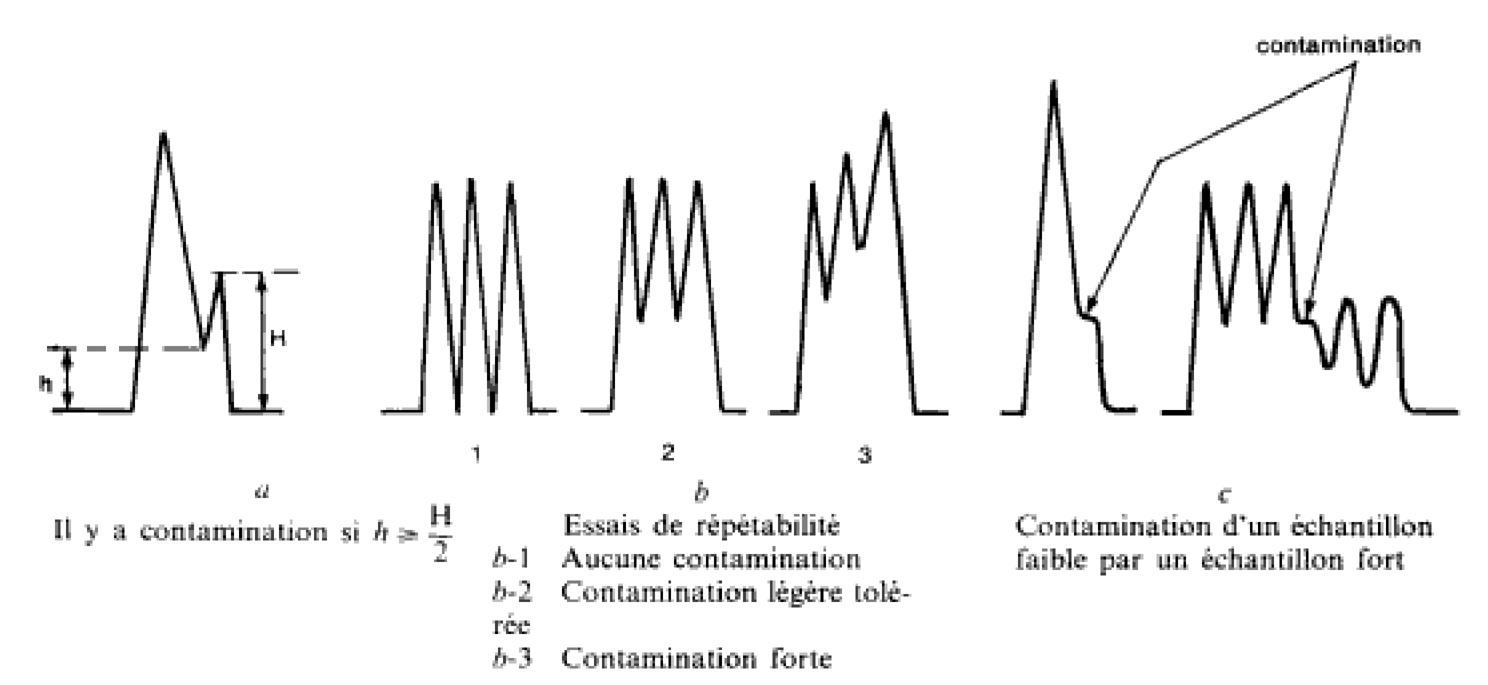


Fig. 21 Détermination des temps $T_{1/2}$.

La **prévention** de la contamination doit être systématiquement faite par :

– une vérification du bullage ;



a
Il y a contamination si $h \geq \frac{H}{2}$

b
Essais de répétabilité
b-1 Aucune contamination
b-2 Contamination légère tolérée
b-3 Contamination forte

c
Contamination d'un échantillon faible par un échantillon fort

Fig. 20 Contrôle de la contamination.

4. Les appareils de transfert

4.1. CARACTÉRISTIQUES DES APPAREILS DE TRANSFERT

Ce sont des appareils d'analyse discontinue, ils sont appelés appareils de transfert, par analogie avec les machines transfert de l'industrie, car il y a transfert de réactifs et d'échantillons puis transfert du milieu réactionnel devant le dispositif de mesure.

Les analyseurs de transfert de 1[re] génération n'étaient pas informatisés, étaient monoparamétriques et réservés aux dosages enzymatiques. Ils présentaient l'avantage, par rapport aux flux continu, d'être économes en réactifs.

Dans ces appareils, les différentes opérations d'un dosage manuel sont reproduits à l'aide d'automate :

- passeur d'échantillons,
- pipettes-seringues,
- agitateur,
- incubateur à température fixe,
- dispositif de mesure.

Ces appareils manquaient de possibilité d'adaptation, ils représentaient des **systèmes fermés,** par opposition aux appareils de transfert de **2[e] génération,** informatisés, qui sont des **systèmes ouverts.**

Par **système fermé,** on entend système dans lequel le traitement des échantillons et des mesures sont imposés une fois pour toute par le constructeur.

Par **système ouvert,** on désigne un analyseur dans lequel le technicien peut programmer les procédures de l'analyse : volumes de l'échantillon et des réactifs, température et durée d'incubation, mesures et traitement des mesures.

Ces appareils comportent une partie mécanique : passeur d'échantillons, dispositif d'addition des réactifs, mécanisme agitateur, incubateur et dispositif de lecture ; ils comportent en outre une partie informatique qui assure la gestion des échantillons, celle des procédures d'analyse (mémorisation des protocoles opératoires) et met en œuvre les voies analytiques, elle traite également les résultats.

4.2. HOME-TESTS ET DOCTOR-TESTS

Home-tests et doctor-tests sont des appareils miniaturisés, d'utilisation simple ne nécessitant pas une technicité particulière.

Le home-test est un appareil grand public, destiné à l'autosurveillance du malade chez lui. L'appareil type est le « Glucotest » des laboratoires AMES, qui permet la détermination de la glycémie chez le diabétique. Le home-test est un appareil généralement monoparamétrique.

Le doctor-test est un système de diagnostic destiné aux cabinets médicaux, une loi de 1975 interdit leur usage en France puisqu'elle donne le monopole des analyses médicales aux biologistes. Ce sont des automates miniaturisés, quelquefois portables, généralement multiparamétriques.

4.3 L'EKTACHEM, APPAREIL DE CHIMIE SÈCHE

Les appareils Ektachem de Kodak utilisent des réactifs secs se présentant sous forme de plaques analytiques.

Une plaque analytique est constituée d'un empilement de couches de réactifs secs, correspondant à tous les réactifs nécessaires au dosage. Un feuillet supérieur reçoit le volume d'échantillon à analyser. Dessous, un polymère poreux isotrope assure une répartition homo-

gène de l'échantillon. L'eau, les petites molécules et les ions diffusent et migrent. Au cours de cette migration, les réactifs se réhydratent. Une membrane semi-perméable filtre les échantillons lorsqu'une déprotéinisation est nécessaire.

Une plaque analytique comporte de 3 à 7 couches réactives selon les dosages.

Après une période d'incubation déterminée, la coloration apparue sur le feuillet inférieur de la plaque analytique est mesurée par réflectométrie. Une abaque permet de déterminer la concentration, connaissant la réflectance.

- Description de la plaque analytique pour le dosage de l'urée (d'après la fiche technique Ektachem-Kodak)

Cette plaque est constituée d'un support polyester sur lequel reposent les différentes couches contenant tous les réactifs nécessaires au dosage.

Le principe de l'analyse est fondé sur l'hydrolyse de l'urée par l'uréase :

$$O{=}C\begin{matrix} \diagup NH_2 \\ \diagdown NH_2 \end{matrix} + H_2O \rightarrow 2\,NH_3 + CO_2\,.$$

L'ammoniac réagit avec un chromogène pour former un complexe coloré. La densité de la coloration est mesurée par réflectométrie. Le volume d'échantillon nécessaire au dosage est de 10 µl. La durée du dosage est de 6 minutes.

L'automate comprend :

– un passeur d'échantillons, et un bras robot qui effectue les prises d'essais de sérum à l'aide d'une pipette-seringue et les dépôts ;

– des distributeurs de plaques analytiques, des bras robots assurent le déplacement des plaques ;

– des modules d'incubation ;

– un module de mesure de la réflectance ;

– un microordinateur qui pilote l'appareil.

5. Les appareils d'analyse centrifuge

Ces appareils utilisent la force centrifuge pour mélanger l'échantillon aux réactifs et transférer le mélange devant le dispositif de lecture. Le dispositif de lecture est un photomètre fixe, dans le faisceau lumineux duquel passent les différentes cuves correspondant aux échantillons.

5.1. L'APPAREIL

L'appareil est constitué d'un rotor sur lequel est disposé un disque de transfert en téflon, creusé de séries radiales de cupules. Il existe aussi des disques de transfert en plastique à usage unique. Chaque rayon, correspondant à un échantillon ou un étalon, comporte une cupule réactifs, une cupule échantillons, une cupule de mélange et la cuve de lecture. La figure 22 montre comment, sous l'effet de la force centrifuge, s'effectuent transferts et mélange.

Le disque de transfert est maintenu à température constante grâce à un système de thermostatisation.

Un dispositif de lavage élimine tout risque de contamination, lorsque l'appareil est équipé d'un disque à usage permanent.

Le dispositif de lecture est fixe ; c'est un système optique permettant la mesure en absorptiométrie moléculaire UV et visible, fluorimétrie, opacimétrie, néphélométrie.

Il faut souligner la nécessité d'une remarquable synchronisation des prises de mesure, dans

VI

INCERTITUDE EXPÉRIMENTALE ET CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les méthodes d'analyse étant complexes et parfois imparfaites, tout résultat expérimental est susceptible d'être entaché d'une erreur.

Le contrôle de qualité a été introduit dans le domaine de la biologie clinique vers les années 50 sous forme de volontariat, et existe sous forme organisée depuis les années 1970. En janvier 1979, un décret d'application fait obligation aux laboratoires d'analyses médicales de subir un contrôle. Dans de nombreux secteurs d'activité (industries alimentaires, pharmacie, cosmétologie...), les entreprises sont amenées à pratiquer des analyses et à autocontrôler leur qualité.

L'erreur est *grossière,* lorsqu'elle est due au non-respect du protocole expérimental, à une confusion de réactif, de matériel, à une faute de calcul ou de transcription de résultat. C'est le type d'erreur qui peut être évitée, sa fréquence dépend essentiellement du manipulateur : son degré de formation, la cadence de son travail, etc. Il n'existe pas de méthode de contrôle des erreurs grossières.

L'erreur est *aléatoire*, lorsqu'elle se produit de façon fortuite, accidentelle. Elle est due à l'imprécision d'une mesure, consécutive à la défaillance momentanée du technicien ou d'un appareil. En analyse biologique, évaluer les erreurs aléatoires consiste à apprécier la *précision,* en contrôlant la *reproductibilité*.

L'erreur est *systématique* lorsqu'elle est due à un appareil déréglé, un réactif de mauvaise qualité, un calibrateur faux, une contamination systématique, la non-spécificité d'une réaction, etc. En analyse biologique, évaluer les erreurs systématiques consiste à apprécier *l'exactitude*. Ce type d'erreur ne peut être évité que si la cause est décelée, il entraîne une déviation de tous les résultats dans le même sens.

Contrôle de précision et contrôle d'exactitude ne sont pas effectués sur chaque résultat, mais sont fondés sur des méthodes statistiques.

Il existe une autre façon d'évaluer *l'incertitude* qui pèse sur un résultat, elle est utilisée par les physiciens et consiste à effectuer un calcul différentiel d'erreur, après avoir estimé pour chaque opération du dosage l'incertitude, c'est-à-dire l'écart maximal entre le résultat expérimental et le résultat réel. Ainsi, lorsque l'on mesure un volume de $V.cm^3$ à l'aide d'une pipette, on peut estimer à $\Delta V.cm^3$ l'incertitude qui pèse sur cette opération ; $\Delta V.cm^3$ est *l'incertitude absolue,* $\frac{\Delta V}{V}$ *l'incertitude relative.*

Le résultat réel est compris entre $V + \Delta V$ et $V - \Delta V$.

— le théorème de l'incertitude absolue sur les sommes et les différences :

$$X = X_1 + X_2, \qquad \Delta X = \Delta X_1 + \Delta X_2,$$
$$Y = Y_1 - Y_2, \qquad \Delta Y = \Delta Y_1 + \Delta Y_2.$$

L'incertitude absolue sur une somme ou une différence est la somme des incertitudes absolues de chacun des termes ;

— le théorème des incertitudes relatives sur les produits et quotients :

$$Z = Z_1 \times Z_2, \qquad \frac{\Delta Z}{Z} = \frac{\Delta Z_1}{Z_1} + \frac{\Delta Z_2}{Z_2},$$
$$W = \frac{W_1}{W_2}, \qquad \frac{\Delta W}{W} = \frac{\Delta W_1}{W_1} + \frac{\Delta W_2}{W_2}.$$

plus probable de la variable et des *paramètres de dispersion* qui rendent compte de la variation des données par rapport à la valeur la plus probable.

1.1. VARIABLES ET DONNÉES

Une variable est un caractère qui peut être exprimé par une mesure *(variable quantitative)* ou non *(variable qualitative)*. On peut citer comme exemples de variables quantitatives : une concentration, la taille d'une cellule, l'activité d'une enzyme et comme exemples de variables qualitatives : espèces bactériennes ou fongiques, sérotypes, groupes sanguins. Une variable qualitative définit une nature, une variable quantitative définit une intensité.

Les individus chez lesquels on collecte les données constituent une *population* ou un *échantillon ;* ils forment une population lorsque la donnée est évaluée chez chacun des individus formant le groupe ; en revanche, ils constituent un échantillon si l'on effectue l'étude statistique sur une partie seulement des individus du groupe, afin d'établir des conclucions se rapportant à l'ensemble de la population.

1.2. TRAITEMENT DES DONNÉES

1.2.1. ORDONNANCEMENT DES DONNÉES

Les données sont ordonnées et regroupées en classes. La courbe de distribution de la figure 1 a été établie après une mise en ordre des données ; les classes sont des intervalles de concentration qui ont été définis comme suit :

$$0{,}09825 \leq C < 0{,}09875$$
$$0{,}09875 \leq C < 0{,}09925$$
$$0{,}09925 \leq C < 0{,}09975 \ .$$
....
$$0{,}10575 \leq C < 0{,}10625$$

Intervalles des classes (en mol/l)	*Centres de classe : valeurs figuratives de la classe (en mol/l)*	*Fréquences absolues*	*Fréquences relatives (en p. 100)*
0,09825-0,09875	0,0985	2	1,45
0,09875-0,09925	0,0990	0	0
0,09925-0,09975	0,0995	2	1,45
0,09975-0,10025	0,1000	4	2,90
0,10025-0,10075	0,1005	8	5,80
0,10075-0,10125	0,1010	22	15,94
0,10125-0,10175	0,1015	26	18,84
0,10175-0,10225	0,1020	36	26,09
0,10225-0,10275	0,1025	11	7,97
0,10275-0,10325	0,1030	10	7,25
0,10325-0,10375	0,1035	8	5,80
0,10375-0,10425	0,1040	1	0,72
0,10425-0,10475	0,1045	3	2,17
0,10475-0,10525	0,1050	1	0,72
0,10525-0,10575	0,1055	2	1,45
0,10575-0,10625	0,1060	2	1,45

Fig. 2 Tableau de distribution des fréquences de l'étalonnage d'une solution de thiosulfate de sodium par pesée d'iodate de potassium.

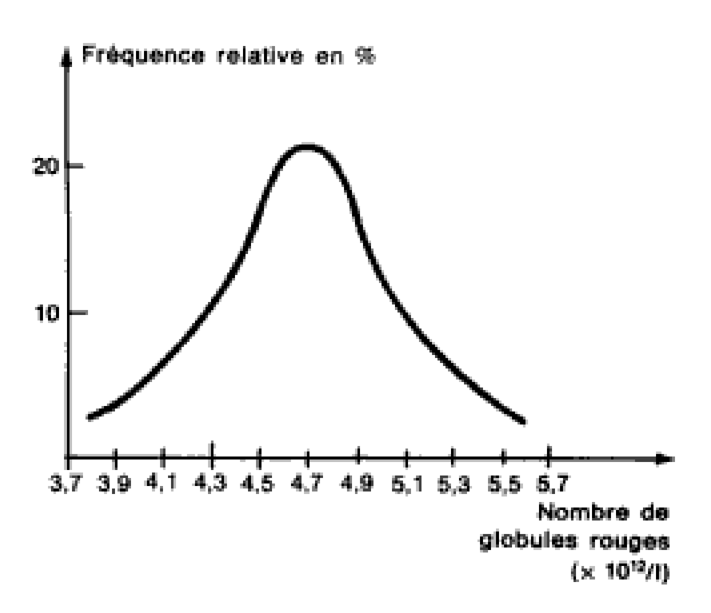


Fig. 4a L'histogramme de la figure 4*a* représente la distribution du nombre de globules rouges par litre de sang, dans une population de femmes adultes, en bonne santé. La distribution est normale, l'histogramme est une courbe de Gauss.

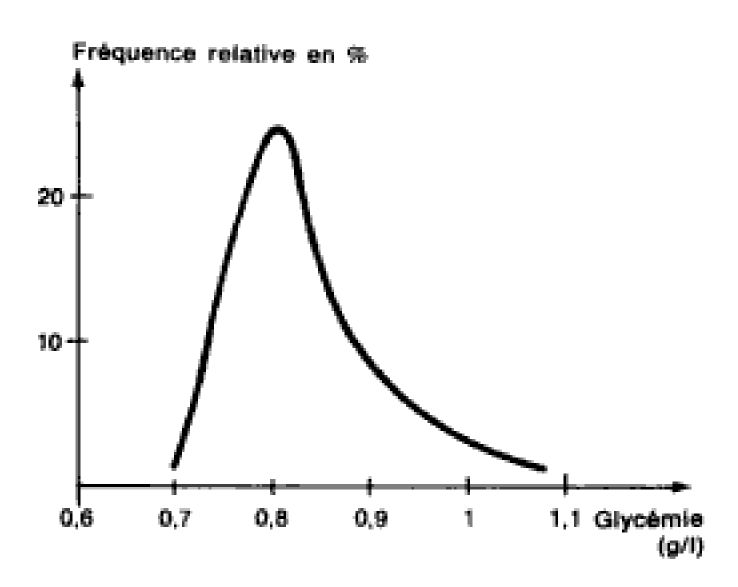


Fig. 4b L'histogramme de la figure 4*b* représente la distribution des glycémies, exprimées en g/l, dans une population d'adultes. La distribution n'est pas normale car les pathologies basses sont rarissimes.

Fig. 4 *a*) Distribution gaussienne. *b*) Distribution non gaussienne.

1.4. CARACTÉRISTIQUES DE POSITION ET DE DISPERSION D'UNE SÉRIE STATISTIQUE À UNE VARIABLE

Ces grandeurs sont fort utiles pour rendre compte de la valeur la plus probable de la variable : paramètres de position, et des écarts des valeurs de la variable par rapport à la moyenne : paramètres de dispersion.

1.4.1. PARAMÈTRES DE POSITION

- **Moyenne arithmétique**

La moyenne arithmétique d'une série statistique est le nombre représenté $\bar{x}$, obtenu en divisant la somme des données par le nombre des données :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i \, .$$

Dans la série statistique représentée dans le tableau 2 p. 145, la moyenne arithmétique est égale à :

$$\bar{x} = 0{,}10191 \text{ mol/l} \, .$$

- **Médiane**

La médiane est la valeur milieu d'une série statistique ordonnée, c'est-à-dire dont les n valeurs de la variable ont été classées par ordre croissant. Pour une série ordonnée comportant un nombre impair de données, la médiane est la valeur de la variable ayant le rang $\frac{n+1}{2}$.

Exemple :

$$\underbrace{6{,}3\text{-}6{,}5\text{-}6{,}6\text{-}6{,}9\text{-}7{,}2\text{-}7{,}3}_{\text{6 valeurs}} \quad \underset{\substack{\uparrow \\ \text{médiane}}}{\text{-}7{,}5\text{-}} \quad \underbrace{7{,}6\text{-}7{,}7\text{-}7{,}8\text{-}7{,}9\text{-}8{,}2\text{-}8{,}5}_{\text{6 valeurs}}$$

Lorsque la série ordonnée comporte un nombre pair de données, la médiane n'existe pas au sens strict de la définition citée antérieurement. Cependant, pour donner une valeur de la médiane, on fait la demi-somme des variables de rang $\frac{n}{2}$ et $\frac{n}{2} + 1$.

Exemple :

6,3-6,5-6,6-6,9-7,2 -$\underset{\text{variable de rang } \frac{n}{2}}{7,3}$-$\underset{\text{variable de rang } \frac{n}{2} + 1}{7,5}$-7,6-7,7-7,8-7,9-8,2

La série comporte douze données, la valeur de rang $\frac{n}{2} = 6$ est 7,3 celle de rang $\frac{n}{2} + 1 = 7$ est 7,5. La médiane est donc égale à $\frac{7,3 + 7,5}{2} = 7,4$.

- **Mode**

Le mode d'une série statistique est la valeur de la variable associée à la plus grande fréquence. Il n'existe pas de formule permettant le calcul du mode, sa détermination est faite sur une représentation graphique.

Certaines distributions peuvent être plurimodales, la distribution normale, gaussienne, est unimodale.

1.4.2. PARAMÈTRES DE DISPERSION

Les paramètres de dispersion renseignent sur la dispersion des valeurs de la variable étudiée autour de la moyenne. Ce sont :

- **Etendue**

L'étendue est la différence entre la plus grande et la plus petite valeur de la variable : étendue $= x_n - x_1$; c'est l'intervalle dans lequel se situent les valeurs de toutes les variables.

- **Déviation moyenne ou écart absolu moyen**

La déviation moyenne est égale au quotient de la somme des valeurs absolues des écarts à la moyenne par le nombre des données :

$$\text{déviation moyenne} = \frac{\sum |x - \bar{x}|}{n}.$$

- **Variance**

La variance est le quotient de la somme des carrés des écarts à la moyenne par le nombre des données lorsque la série statistique étudiée est une population, ou par le nombre des données moins une si la série statistique étudiée est un échantillon.

$$\text{Variance d'une population : } \sigma^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}$$

$$\text{Variance d'un échantillon : } s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}.$$

- **Ecart type**

C'est le paramètre de dispersion le plus utilisé en statistique, l'écart type est la racine carrée de la variance.

Ecart type d'une population :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Ecart type d'un échantillon :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}.$$

- **Coefficient de variation**

Le coefficient de variation (CV) est le rapport exprimé en pourcentage entre l'écart-type et la moyenne arithmétique.

$$\text{CV de population} = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

$$\text{CV d'échantillon} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100.$$

- **Quantiles**

Les paramètres dénommés quartiles, quintiles, déciles, centiles sont appelés d'une façon générale quantiles. Les quartiles sont les trois valeurs de la variable : quartile 1, quartile 2 et quartile 3, qui partagent les données d'une série statistique ordonnée en quatre groupes de même effectif. Le quartile 2 est la médiane.

Exemple :

0-8-0,82 - [0,85] - 0,92-1,02 - [1,09] - 1,30-1,50 - [1,63] - 1,82-1,93

quartile 1 — quartile 2 — quartile 3

Les quartiles ne sont pas au sens strict de la définition des paramètres de dispersion, on utilise les intervalles interquartiles relatif et absolu.

Intervalle interquartile absolu = quartile 3 – quartile 1.

Intervalle interquartile relatif =

$$\frac{(\text{quartile } 3 - \text{quartile } 1)}{\text{quartile } 2}.$$

Les quintiles sont les quatre valeurs de la variable qui partagent les données d'une série statistique ordonnée en cinq groupes de même effectif.

Les déciles et les centiles sont respectivement les neuf et les quatre-vingt-dix-neuf valeurs de la variable qui partagent une série statistique en dix et cent groupes de même effectif.

Le percentile p % est la valeur de la variable qui partage les données d'une série statistique ordonnée en un groupe de valeurs inférieures dont l'effectif représente p % des données et un groupe de valeurs supérieures dont l'effectif représente (100 – p) % des données.

1.5. DISTRIBUTION NORMALE ET DISTRIBUTION DES FRÉQUENCES EN BIOLOGIE

La distribution normale est une notion abordée au paragraphe 1.3 : une distribution normale est représentée graphiquement par une courbe de Gauss, histogramme symétrique. Cependant, la symétrie de la courbe ne garantit pas une distribution normale ; la répartition des données doit respecter un certain nombre de conditions :

– 68,3 p. 100 des données doivent être réparties dans l'intervalle $(\bar{x} \pm \sigma)$ dans le cas d'une population ou $(\bar{x} \pm s)$ dans le cas d'un échantillon ;

– 95,4 p. 100 des données doivent être réparties dans l'intervalle $(\bar{x} \pm 2\,\sigma)$ ou $(\bar{x} \pm 2\,s)$;

– et 99,7 p. 100 des données doivent être réparties dans l'intervalle $(\bar{x} \pm 3\,\sigma)$ ou $(\bar{x} \pm 3\,s)$.

- **Limites d'erreur, intervalle de confiance**

En analyse biologique, quelles que soient les mesures prises pour que la procédure du dosage soit précise, tous les résultats des mesures effectuées sur le même échantillon ne sont pas identiques.

La reproductibilité n'est jamais parfaite. Quelles limites doit-on fixer à l'intervalle des résultats acceptables ? *On considère arbitrairement que 95 p. 100 des résultats sont satisfaisants*, sous réserve que les bonnes pratiques du laboratoire soient respectées dans les domaines de la technicité, du matériel et des réactifs.

Cela signifie que le *degré de confiance* que l'on peut attribuer au résultat d'une analyse est de 95 p. 100.

En d'autres termes, si l'on admet que la distribution des fréquences des résultats d'une analyse médicale suit une distribution normale, tout résultat ne s'écartant pas plus de la moyenne de $\pm 2\,s$, doit être considéré comme acceptable.

L'intervalle $\bar{x} \pm 2\,s$ s'appelle *l'intervalle de confiance.*

• Intervalles de référence

L'interprétation du résultat d'une analyse, faite par le médecin, repose sur la comparaison de ce résultat aux valeurs normales, appelées aussi valeurs usuelles. Ces valeurs normales sont exprimées par un intervalle de référence, valable pour une population donnée (âge, sexe).

La détermination de l'intervalle de référence est fondée sur les statistiques ; il suffit de mesurer le paramètre biologique considéré (glycémie, urémie, numération des hématies, etc.) sur un échantillon de la population ; on admet que 95 p. 100 des personnes ont un résultat normal.

Par conséquent, si la distribution des résultats est normale, l'intervalle de référence est égal à $\bar{x} \pm 2\,s$.

Si la distribution n'est pas normale (glycémie, activités enzymatiques pour lesquelles il n'y a pratiquement pas de pathologie basse), l'intervalle de référence est défini comme l'intervalle entre le percentile 2,5 p. 100 et le percentile 97,5 p. 100. Naturellement l'intervalle de référence doit tenir compte des souhaits de la clinique.

• Mode d'expression des résultats

Deux règles gouvernent l'écriture d'un résultat. La première est que tout chiffre figurant dans l'expression du résultat doit avoir une signification. Ce qui veut dire que le nombre de décimales est fonction de l'écart type : pour un écart type de l'ordre de l'unité, on ne met pas de chiffre après la virgule ; pour un écart type de l'ordre du dixième d'unité, on met un chiffre après la virgule ; et ainsi de suite.

La deuxième règle est qu'il est inutile d'exprimer un résultat avec une précision qui excède les nécessités du diagnostic.

2. Exactitude et précision d'une méthode d'analyse

2.1. EXACTITUDE

L'*exactitude* d'une analyse exprime la concordance entre la valeur attendue * d'un résultat et la moyenne arithmétique de plusieurs mesures faites sur l'échantillon.

Les grandeurs qui caractérisent l'exactitude d'une méthode d'analyse sont :

* La valeur attendue d'un résultat peut différer sensiblement de la valeur vraie de ce même résultat. Cette dernière est obtenue à partir d'une méthode de référence, en revanche, la valeur attendue est associée à un protocole opératoire donné. Pour le paramètre biologique d'un échantillon, il n'existe qu'une valeur vraie, mais autant de valeurs attendues, qu'il existe de méthodes de dosage.

– le degré d'exactitude absolu $(x_0 - \bar{x})$ où $x_0 =$ valeur attendue ; $\bar{x} =$ moyenne arithmétique = meilleure estimation du résultat ;

– le degré d'exactitude relatif $\dfrac{x_0 - \bar{x}}{x_0}$.

L'exactitude est d'autant plus grande que les valeurs du degré d'exactitude sont faibles.

Le *contrôle de l'exactitude* consiste à analyser un *échantillon étalon.* L'étalon est introduit au hasard dans une série d'analyses ; le résultat ne doit s'écarter de la valeur attendue que dans les limites définies par l'intervalle de confiance. La détermination de la valeur attendue est réalisée méthode par méthode.

Les causes de l'inexactitude d'une analyse sont les *erreurs systématiques ;* par exemple : l'erreur de réglage d'un appareil, l'utilisation d'un calibrateur (p. 154) faux, l'utilisation d'enzymes auxiliaires impures ; l'utilisation d'une lumière monochromatique, la température d'un dispositif de thermostatisation fausse, l'utilisation d'un diluteur faux, etc.

La *correction de l'inexactitude*, c'est-à-dire la correction des *erreurs systématiques*, est réalisée en contrôlant l'appareillage et les réactifs.

A titre d'exemple, on peut décrire le contrôle technologique associé à la mesure de l'activité d'une enzyme. L'expression littérale du résultat est :

$$AE = \frac{\Delta A}{t} \times \frac{10^6}{\varepsilon l} \times \frac{V_t}{PE}$$

AE = activité de l'enzyme en mU/cm^3
$\frac{\Delta A}{t}$ = variation d'absorbance par min en min^{-1}
ε = coefficient d'absorption molaire linéique en mol^{-1}, $l.cm^{-1}$
l = trajet optique en cm
V_t = volume total en cm^3
PE = volume de la prise d'essai en cm^3.

Les facteurs à contrôler sont :

– la *température :* une variation de 1 °C entraîne une erreur systématique qui peut atteindre 8 p. 100. Sont à contrôler l'exactitude et la constance de la température ; une variation de ± 0,2 °C entraîne une imprécision de ± 2 p. 100 sur le résultat ;

– l'*absorbance :* le contrôle de l'absorbance est réalisé en vérifiant l'exactitude des longueurs d'onde indiquées par l'appareil, l'exactitude des absorbances, la linéarité de l'appareil et l'absence d'interférence de la lumière parasite ;

– le *temps :* sont vérifiés les chronomètres, les enregistreurs à défilement de papier et les tables traçantes ;

– le *trajet optique :* la longueur de la cuve est mesurée avec précision. Certaines cuves en plastique peuvent être l'objet de déformations ;

– les *volumes :* doivent être contrôlés les diluteurs, les pipettes automatiques, etc.

Une fois décelées, les erreurs systématiques sont aisément corrigées, à l'exception, cependant, du manque de spécificité de la réaction.

2.2. PRÉCISION

La *précision* d'une méthode d'analyse est exprimée par la concordance des résultats de plusieurs mesures faites sur le même échantillon. Les grandeurs qui rendent compte de la précision sont l'écart type et le coefficient de variation.

Le *contrôle de la précision* est pratiqué par :

– la *répétabilité :* plusieurs mesures sont effectuées sur le même échantillon, par le même technicien, avec les mêmes réactifs, le même jour ;

– la *reproductibilité :* plusieurs mesures sont effectuées sur le même échantillon, tous les jours, jour après jour, par le même technicien ou par des techniciens différents.

Le *contrôle de la précision* se pratique en analysant un échantillon de contrôle, de même nature que celui qui est dosé, non titré, mais de composition constante.

Les causes de l'*imprécision* sont les *erreurs aléatoires,* c'est-à-dire les erreurs fortuites, imprévisibles, accidentelles. Ces erreurs aléatoires sont essentiellement produites par des imprécisions de mesure : pipettage, chute de burette, lecture d'un cadran, pesée, etc. Les erreurs aléatoires sont en général faibles, mais impossibles à déceler.

Si l'on pratique un nombre relativement grand d'analyses, les erreurs aléatoires s'écartent de la moyenne tant par défaut que par excès, par conséquent la courbe de distribution des fréquences est gaussienne.

3.1. ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE, ÉCHANTILLONS ÉTALONS, CALIBRATEURS

Les *échantillons de contrôle* ne sont *pas titrés ;* ils sont utilisés en *contrôle de précision.*

Les *échantillons étalons* sont titrés par le fabricant, *méthode par méthode,* ce qui signifie qu'il y a autant de *valeurs vraies* que de méthodes de dosage ; ils sont utilisés en *contrôle d'exactitude.*

Les *calibrateurs* sont titrés par le fabricant, par une *méthode de référence,* ils sont utilisés pour le calibrage des appareils.

Les échantillons étalons peuvent être utilisés en contrôle de précision, mais leur coût élevé ne justifie pas cet usage ; en revanche, ils ne peuvent être utilisés comme calibrateur.

Les trois propriétés fondamentales des échantillons de contrôle, des étalons et des calibrateurs sont :

– *stabilité :* la composition des échantillons de contrôle doit être constante dans le temps, afin de permettre des contrôles à moyen et long terme ;

– *homogénéité :* tous les échantillons de contrôle d'un même lot doivent être identiques ;

– *composition voisine* de celle de l'échantillon à doser : on trouve dans le commerce essentiellement des sérums, mais peuvent également être utilisés des urines et des liquides céphalorachidiens.

Ces échantillons de contrôle sont presque toujours *lyophilisés ;* sous cette forme leur stabilité est de l'ordre de deux ans, et leurs propriétés identiques aux échantillons frais si leur reconstitution a été faite dans de bonnes conditions.

La *congélation* à – 25 °C ne permet une utilisation convenable des échantillons de contrôle que pour un laps de temps relativement court (quelques jours) ; ils se dégradent lentement et leur composition dérive légèrement.

On appelle *étalons primaires* des solutions aqueuses ; ces étalons primaires sont faciles à préparer, à étalonner et sont peu coûteux, mais ils présentent l'inconvénient majeur de n'avoir ni les propriétés physiques, ni la matrice de l'échantillon à doser.

3.2. MODALITÉS DU CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le laboratoire gère, sous sa propre autorité, le *contrôle interne* de qualité ; c'est un contrôle permanent qui, jour après jour, permet au chef de laboratoire de prendre la décision de valider ou non les résultats ; c'est aussi un contrôle à long terme qui permet d'évaluer, sur une période de temps d'une durée d'un à plusieurs mois, les réactifs et l'appareillage.

3.2.1 CONTRÔLE INTERNE

• Le contrôle interne est fondé sur un lot d'échantillons de contrôle.

On établit la valeur cible et l'intervalle de confiance en effectuant une mesure sur un échantillon statistique de 30 sérums de contrôle ; la valeur cible est la moyenne arithmétique des 30 résultats ($\bar{x}$), l'intervalle de confiance est égal à la moyenne arithmétique plus ou moins 2 écarts types : ($\bar{x} + 2\,s$).

On est souvent amené à utiliser 2 sérums de contrôle : l'un dont la valeur cible est normale, l'autre pathologique (valeur haute ou valeur basse).

• Les cartes de contrôle sont de différents types, la plus utilisée est celle de Levey et Jennings (fig. 6). On utilise une carte par lot de sérums de contrôle.

Cette carte porte, sur l'axe des ordonnées, la concentration du paramètre analysé, la

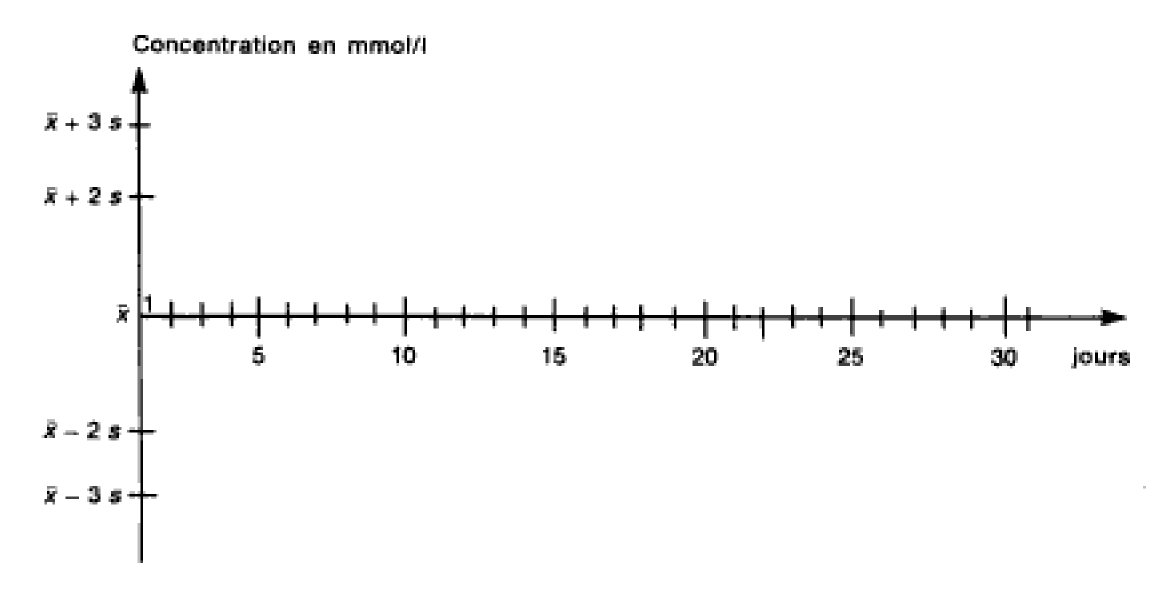


Fig. 6 Carte de Levey et Jennings.

valeur cible $\bar{x}$, l'intervalle de confiance $\bar{x} \pm 2s$ et l'intervalle $\bar{x} \pm 3s$. L'axe des abscisses est graduée en jours, une carte est valable pour un mois.

Quelles sont les règles empiriques qui autorisent le chef de laboratoire à valider les résultats d'une journée concernant un paramètre biochimique ? Il dispose de deux cartes de Levey et Jennings, chacune correspond à un sérum de contrôle : le premier a une valeur cible normale, le second une valeur cible pathologique (haute ou basse).

Si les résultats des deux sérums de contrôle, sont dans les intervalles $\bar{x} \pm 2s$, les résultats de la journée sont validés. Il en est de même si le résultat d'un sérum est dans l'intervalle $\bar{x} \pm 2s$, et si le résultat de l'autre est hors l'intervalle $\bar{x} \pm 2s$, mais dans l'intervalle $\bar{x} \pm 3s$.

En revanche, les résultats de la journée sont refusés si les deux résultats des sérums de contrôle sont hors l'intervalle $\bar{x} \pm 2s$ ou si l'un des résultats est dans l'intervalle $\bar{x} \pm 2s$ et l'autre hors l'intervalle $\bar{x} \pm 3s$.

Ce type de carte permet aussi un contrôle à long terme.

Des résultats qui se situent, pendant un certain nombre de jours, du même côté de la valeur moyenne ($\bar{x}$) sont l'indication d'une erreur systématique. On contrôle la méthode avec un sérum de contrôle dosé et, le cas échéant, on recherche l'erreur commise en vérifiant chacune des opérations du dosage.

Une dérive croissante ou décroissante des résultats est une indication d'altération d'un réactif ou de l'évolution de la concentration d'un étalon.

Un résultat hors contrôle est le signe d'une erreur fortuite. Ce résultat doit être vérifié par un autre échantillon du même sérum de contrôle.

La deuxième carte utilisée est celle de Younden, mais beaucoup moins fréquemment que celle de Levey et Jennings.

Le diagramme de Younden permet l'analyse des résultats obtenus à partir de deux sérums de contrôle. On porte sur les axes perpendiculaires d'un graphe les valeurs moyennes des deux échantillons. A partir du point de rencontre des valeurs moyennes, utilisé comme centre, on trace un cercle de diamètre égal à 3,03 σ. Si le dosage est exact et reproductible les résultats obtenus pour l'échantillon 1 et 2 figureront un point situé dans le cercle. Si tel n'est pas le cas, le résultat est faux : par excès, par défaut, ou par défaut de reproductibilité.

Contrôle permanent. Glycémie / Ortho-toluidine. Mois de mars 79

C en mmol/l

$\bar{x}+3s$

$\bar{x}+2s$

$\bar{x}$

$\bar{x}-2s$

$\bar{x}-3s$

Résultat hors contrôle = erreur fortuite

Plateau = erreur systématique

5 10 15 20 25 30 Jours

Dosage précis

Dosage précis

Dérive = altération d'un réactif, évolution d'un étalon

Fig. 7 Contrôle sur un mois, carte de Levey et Jennings.

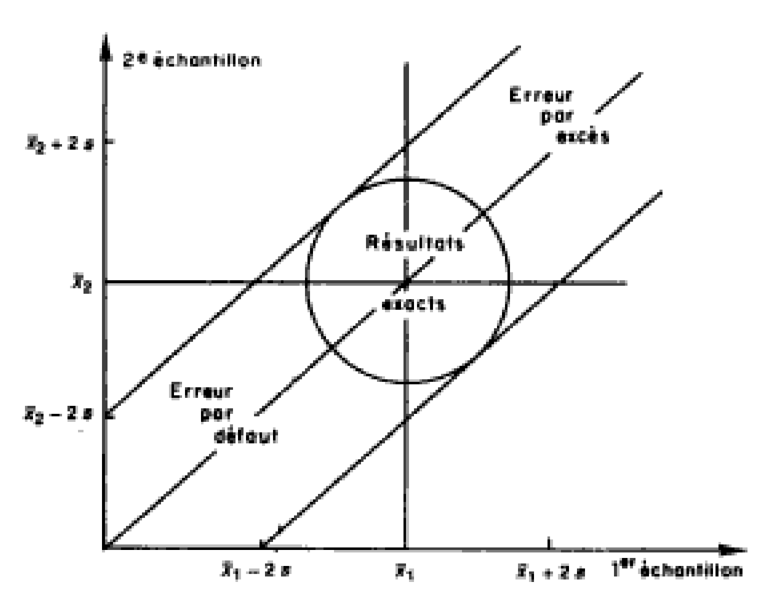


Fig. 8 Le diagramme de Younden.

3.2.2 UTILISATION DES SÉRUMS A ANALYSER

C'est une forme différente du contrôle interne, fondée sur le fait que bon nombre de résultats obtenus au laboratoire sont normaux. La moyenne journalière des résultats situés dans la zone normale doit être approximativement constante d'un jour à l'autre ; s'il existe une variation importante de cette moyenne, elle est due à un erreur systématique.

Cette technique présente en outre l'avantage de décéler des erreurs qui ne pourraient l'être autrement : erreurs de prélèvements, altérateurs dues à un éventuel transport, anticoagulants, antiglycolytiques, etc. Cette méthode ne s'applique que si le nombre de dosages pratiqués dans le laboratoire important.

La moyenne calculée peut être la moyenne des sujets normaux, la moyenne de toutes les analyses, il vaut mieux utiliser la moyenne tronquée, c'est-à-dire la moyenne des résultats compris dans l'intervalle $\bar{x} \pm 2\,\sigma$.

3.2.3 LE CONTRÔLE EXTERNE

Ce contrôle est organisé par une association régionale ou nationale. Il consiste à envoyer, à chacun des laboratoires, un sérum à analyser pour n paramètres, à une fréquence donnée (qui peut être de une fois par semaine). Les résultats sont collectés par l'association organisatrice qui établit l'histogramme représentant la distribution des résultats, calcule la moyenne $\bar{x}$ et l'écart-type σ, et élimine les valeurs aberrantes, en dehors de la zone ($\bar{x} \pm 3\sigma$). Puis elle calcule également la moyenne tronquée $\bar{x}'$ et l'écart-type tronqué σ'.

Ces résultats situés dans la zone $\bar{x}' \pm \sigma'$ sont déclarés bons ; ceux situés dans la zone $\bar{x}' \pm 2\sigma'$ sont déclarés convenables, les autres sont déclarés mauvais.

La précision et l'exactitude des résultats d'analyse biologique sont devenues des notions concrètes et mesurables. Le technicien ne peut que s'en féliciter ; la qualité de son travail en dépend, même si le contrôle peut apparaître quelquefois tyrannique.

ANNEXES

TEXTES OFFICIELS RELATIFS AU CONTRÔLE DE QUALITÉ DANS LES LABORATOIRES D'ANALYSES BIOLOGIQUES

Décret n° 78-1148 du 7 décembre 1978 relatif au contrôle de qualité des analyses de biologie médicale prévu par l'article L. 761-14 du code de la santé publique.

Le Premier ministre,

Sur le rapport du ministre de la santé et de la famille, du ministre du budget et du ministre de l'agriculture.

Vu le chapitre 1er du titre III du livre VII du code de la santé publique et notamment l'article L. 761-14, ensemble l'article 2 de la loi n° 75-626 du 11 juillet 1975 relative aux laboratoires d'analyses de biologie médicale ;

Vu le décret n° 76-1004 du 4 novembre 1976 fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyses de biologie médicale ;

Vu les lois n° 50-54 du 14 janvier 1950 et n° 57-377 du 26 mars 1957, ainsi que le décret n° 55-686 du 20 mai 1955 relatifs au laboratoire national de la santé ;

Vu le décret n° 70-1052 du 13 novembre 1970 modifié portant organisation de l'administration centrale du ministère de la santé publique;

Vu l'avis de la commission nationale permanente de biologie médicale ;

Vu l'avis de la caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés ;

Après avis du Conseil d'État (section sociale).

DÉCRÈTE :

Art. 1er. — Le contrôle de qualité des analyses de biologie médicale institué par l'article L. 761-14 du code de la santé publique a pour but de déterminer la valeur des résultats des analyses exécutées par chacun des laboratoires qui y est soumis, compte tenu des techniques, des réactifs et du matériel employés, en les comparant, le cas échéant, avec les résultats obtenus

par l'ensemble des laboratoires habilités à exécuter les mêmes catégories d'analyses.

Il tend, d'une part, à assurer la fiabilité et le perfectionnement des analyses de biologie médicale dans l'intérêt général de la santé publique et, d'autre part, à permettre à chaque laboratoire de vérifier la valeur de ses techniques et son bon fonctionnement.

Art. 2. — Le contrôle de qualité est organisé, sous l'autorité du ministre chargé de la santé publique par le directeur général du laboratoire national de la santé. Il est assuré sur le plan technique par des organismes publics ou privés agréés à cet effet par le ministre de la santé publique après avis de la commission nationale permanenté de biologie médicale.

Le nombre des opérations de contrôle de qualité sera au moins de huit par an, toutes catégories d'analyses soumises au contrôle confondues, à l'expiration du délai de deux ans prévu à l'article 11.

Art. 3. — Le laboratoire national de la santé constitue et tient à jour le fichier des laboratoires publics ou privés soumis aux dispositions du chapitre 1er du titre III du livre VII du code de la santé publique. Pour chaque laboratoire, ce fichier comporte un numéro de code destiné à assurer l'anonymat des opérations de contrôle. Ce fichier comporte également la mention de la ou des catégories d'analyses que le laboratoire est autorisé à exécuter en application soit de l'article L. 757 du code de la santé publique, soit de l'article 2 de la loi du 11 juillet 1975 susvisée.

Art. 4. — Il est institué une commission du contrôle de qualité des analyses de biologie médicale. Elle est présidée par le directeur général du laboratoire national de la santé ou son représentant et comprend, en outre, pour un tiers, des représentants de l'administration et des organismes d'assurance maladie suivants : caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés, caisse centrale de secours mutuels agricoles, caisse autonome nationale d'assurance maladie des travailleurs non salariés des professions non agricoles, pour un tiers, des représentants des syndicats les plus représentatifs des directeurs de laboratoires et des biologistes hospitaliers et, pour un tiers, des représentants de sociétés savantes dont l'activité concerne la biologie médicale et des personnalités médicales ou scientifiques qualifiés.

Ne peuvent être membres de cette commission les personnes qui sont appelées à participer à l'exécution technique du contrôle de qualité des analyses de biologie médicale.

Les membres de la commission sont nommés par le ministre chargé de la santé publique, les représentants des syndicats professionnels devant être choisis sur des listes d'au moins quatre noms présentées par ceux-ci.

Les représentants des syndicats professionnels, les représentants des sociétés savantes et les personnalités qualifiées sont nommés pour une durée de trois ans ; leur mandat est renouvelable.

Par décision du président ou à la demande de la majorité des membres de la commission, peuvent être appelées à prendre part à ses travaux, avec voix consultative, toutes personnes dont la collaboration paraît utile pour la mise en œuvre du contrôle de qualité des analyses.

Art. 5. — La commission du contrôle de qualité des analyses est consultée par le directeur général du laboratoire national de la santé sur les problèmes scientifiques, techniques, administratifs et financiers que pose l'organisation du contrôle, notamment sur les modalités de mise en œuvre du contrôle, le choix des organismes chargés de l'exécution du contrôle et le cahier des charges qui doit leur être imposé, l'exploitation des résultats des contrôles et les conclusions à en tirer notamment en ce qui concerne la qualité des techniques, des réactifs et du matériel, la détermination des anomalies dans les résultats des analyses, le rapport annuel d'activité prévu au dernier alinéa de l'article 6 ci-dessous, la communication au ministre chargé de la santé publique des résultats de laboratoires déterminés.

Il est formé au sein de la commission un comité permanent présidé par le directeur général du laboratoire national de la santé ou son représentant et comprenant en outre six membres dont deux de chacune des trois catégories de membres prévus à l'article 4. Le comité permanent est saisi en cas d'urgence. La commission peut lui donner délégation pour délibérer en son lieu et place sur toute affaire de sa compétence.

La commission peut décider de constituer en son sein des sections ou des groupes de travail pour l'étude de certaines des questions pour lesquelles elle est appelée à émettre un avis.

Art. 6. — L'exécution technique du contrôle est assurée selon les instructions du directeur général du laboratoire national de la santé par des organismes publics ou privés agréés par le ministre chargé de la

santé après avis de la commission du contrôle de qualité des analyses et de la commission nationale permanente de biologie médicale.

L'agrément est donné pour une période de trois ans renouvelable dans les mêmes conditions. Il implique l'obligation de se conformer au cahier des charges élaboré dans les conditions prévues à l'article ci-dessus.

Les organismes publics ou privés agréés communiquent les résultats de tous les laboratoires contrôlés avec leurs observations au directeur général du laboratoire national de la santé ; celui-ci adresse les résultats comparatifs, les statistiques d'ensemble et les commentaires auxquels ils donnent lieu, à chacun des laboratoires soumis au contrôle.

La synthèse des renseignements fournis par les résultats des contrôles de qualité est faite au moins une fois par an par le directeur général du laboratoire national de la santé dans un rapport rédigé après consultation de la commission du contrôle de qualité des analyses ; ce rapport est adressé à chacun des laboratoires soumis au contrôle ainsi qu'à la commission nationale permanente de biologie médicale.

Le directeur général du laboratoire national de la santé dresse annuellement un rapport sur l'activité de ce laboratoire dans le domaine du contrôle de qualité, comportant notamment un état détaillé des charges de fonctionnement afférentes à ce contrôle ; ce rapport est adressé au ministre chargé de la santé publique et communiqué également à la commission nationale permanente de biologie médicale.

Art. 7. — Lorsque les résultats d'un laboratoire présentent des anomalies répétées et importantes au regard de leur utilisation médicale, le cas de ce laboratoire est soumis anonymement à la commission du contrôle de qualité, dont l'avis est transmis au ministre chargé de la santé publique.

Le ministre peut aussi demander communication des résultats d'un laboratoire déterminé ; dans ce cas, ils sont accompagnés d'un avis de la commission du contrôle de qualité.

Art. 8. — Le directeur général du laboratoire national de la santé signale au ministre chargé de la santé publique les laboratoires qui ne se soumettraient pas au contrôle de qualité.

Art. 9. — Le laboratoire national de la santé garde pendant la durée normale de leur conservation des exemplaires des échantillons ayant servi aux contrôles de qualité en vue de permettre, le cas échéant, soit une expertise de ces échantillons à la demande d'un laboratoire, soit le contrôle de la bonne exécution des analyses prévu à l'article L. 761-13 du code de la santé publique.

Art. 10. — Tout laboratoire soumis au contrôle de qualité doit conserver pendant cinq ans les résultats des analyses qu'il a exécutées pour les besoins de ce contrôle.

Ces résultats doivent être présentés à l'occasion du contrôle prévu à l'article L. 761-13 du code de la santé publique.

Art. 11. — Le contrôle de qualité des analyses de biologie médicale est mis en œuvre par étapes, compte tenu des possibilités techniques. Pour les analyses relevant de la biochimie, de l'hématologie, de la bactériologie-virologie et de la parasitologie, il doit être mis en œuvre dans un délai maximum de deux ans, à des dates fixées par arrêtés du ministre chargé de la santé publique.

La mise en œuvre du contrôle de qualité pour les analyses relevant d'autres disciplines de la biologie médicale fera l'objet de décrets ultérieurs.

Art. 12. — Sans préjudice du contrôle obligatoire prévu aux articles ci-dessus, des contrôles de qualité des analyses peuvent être organisés régionalement dans le but d'apporter aux laboratoires une assistance technique et de promouvoir un contrôle permanent de leur fonctionnement. Ces contrôles facultatifs sont organisés par des organismes publics ou des associations privées agréés à cette fin par le ministre chargé de la santé publique, après avis de la commission nationale permanente de biologie médicale et selon une procédure fixée par arrêté dudit ministre.

Lesdits organismes ou associations agréés envoient chaque année un compte rendu de leur activité de contrôle au préfet du département où ils ont leur siège et au laboratoire national de la santé.

Art. 13. — Le ministre de la santé et de la famille, le ministre du budget et le ministre de l'agriculture sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent décret, sui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 7 décembre 1978.

VII
MICROSCOPIE

• Le microscope est un instrument d'optique qui fournit des images très agrandies d'objets invisibles à l'œil nu.

• Le microscope, que chacun connaît, est le microscope optique, dit « à fond clair ». Il se compose de deux systèmes de lentilles. L'objectif et l'oculaire, supportés par une partie mécanique, le statif.

• Il existe d'autres microscopes optiques adaptés à des conditions particulières d'observation :

– le microscope à fond noir adapté à l'observation d'objets que leurs dimensions ou leur transparence rendent difficilement observables par les méthodes habituelles ;

– le microscope polarisant renseigne sur les propriétés optiques des corps : pouvoir rotatoire ou biréfringence ;

– le microscope à contraste de phase adapté à l'observation d'objets provoquant un déphasage dépendant de l'indice et de l'épaisseur des régions traversées ;

– le microscope à fluorescence adapté à l'observation d'objets fluorescents.

• Lorsque le microscope optique n'est pas suffisant, on se sert du microscope électronique utilisant non plus les radiations visibles mais l'interaction avec la matière d'un faisceau d'électrons.

Les microscopes optiques sont encore appelés photoniques, les photons jouant le rôle des électrons dans les microscopes électroniques.

1. Limite de résolution ; pouvoir séparateur

On définit la *limite de résolution* d'un microscope par la plus petite distance entre deux points A et B que l'on peut observer (en distinguant les deux points).

Le *pouvoir séparateur* d'un microscope est d'autant plus grand que la limite de résolution est petite.

Un calcul portant sur les phénomènes de diffraction montre que la limite de résolution vérifie la relation suivante :

$$L = \frac{0{,}61 \cdot \lambda}{n \sin U}$$

où λ est la longueur d'onde, n l'indice de réfraction du milieu situé entre l'objet et l'objectif du microscope, U est le demi-angle au sommet du cône sous lequel est vu l'objectif à partir du milieu de la préparation à observer (Fig. 1).

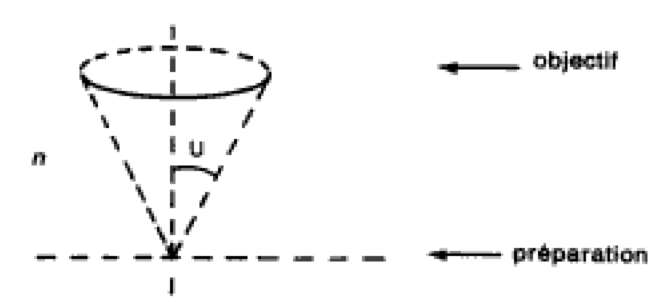


Fig. 1 Ouverture numérique.

On appelle ouverture numérique (O.N.) le produit $n \sin u$.

Pour diminuer la limite de résolution, on peut :

– augmenter l'indice ; on emploie alors un objectif à immersion ;

– augmenter u ; cela est difficile car on perd alors de la puissance lumineuse ;

– diminuer λ ; on utilise un rayonnement corpusculaire. En effet la relation de Broglie permet de calculer la longueur d'onde associée à des électrons dont la masse est m et la vitesse v : $\lambda = \frac{h}{mv}$ avec h : constante de Planck ($h = 6{,}62.10^{-34}$ J.s).

Par exemple, l'onde associée à des électrons accélérés par une différence de potentiel de 100 kV a une longueur d'onde $\lambda = 0{,}005$ nm.

Le tableau ci-après résume quelques valeurs de limite de résolution :

œil	0,1 mm
microscope visible	0,2 µm
microscope UV	0,1 µm
rayons X	1 nm
microscope électronique	0.5 nm

2. Le microscope optique visible (à fond clair)

2.1. SCHÉMA OPTIQUE

La figure 2 représente le trajet des rayons lumineux dans le cas d'une observation dite « rapprochée » dans laquelle l'image définitive (virtuelle) se trouve à une vingtaine de centimètres de l'œil.

On voit que l'objectif (O_1) donne de l'objet AB une image réelle, A_1B_1, renversée ; l'oculaire donne de A_1B_1 une image A'B' virtuelle et droite.

2.2 L'OBJECTIF

C'est un système centré convergent formé de plusieurs lentilles simples ou composés, qui donne de l'objet une image réelle. On le caractérise par :

– l'ouverture numérique ON = $n \sin u$ (voir § 1) ;

– la distance focale f', de quelques millimètres ;

– la distance frontale, comprise entre l'objet et la lentille frontale, lorsque la mise au point est faite ;

– le grandissement $\gamma = \frac{A_1B_1}{AB}$ (voir fig. 1) ;

– la netteté des contours de l'image (utilisation d'objectifs dits « achromatiques »).

La figure 2 représente un objectif avec ses indications.

2.3. L'OCULAIRE

C'est un système centré formé de deux ou plusieurs lentilles, donnant de l'image objective une image virtuelle, droite et agrandie.

objectif
objet
platine
condenseur
Diaphagme du condenseur (dans le plan focal de ce dernier)
D₁ = diaphagme de champ de la lampe
L
Source lumineuse
S
Miroir plan

Fig. 3 Eclairage de Köhler.

Fig. 4 Centrage de l'éclairage.

phragme du condenseur. Il faudra, au contraire, l'ouvrir pour les préparations colorées.

Le contraste est obtenu par simple déplacement en hauteur du système d'éclairage.

2.6. UTILISATION DU MICROSCOPE

2.6.1. MISE AU POINT

– Amener l'objectif contre la lamelle en évitant les heurts.

– Relever lentement le tube microscopique jusqu'à obtention d'une image.

– Parfaire la mise au point à l'aide de la vis micrométrique.

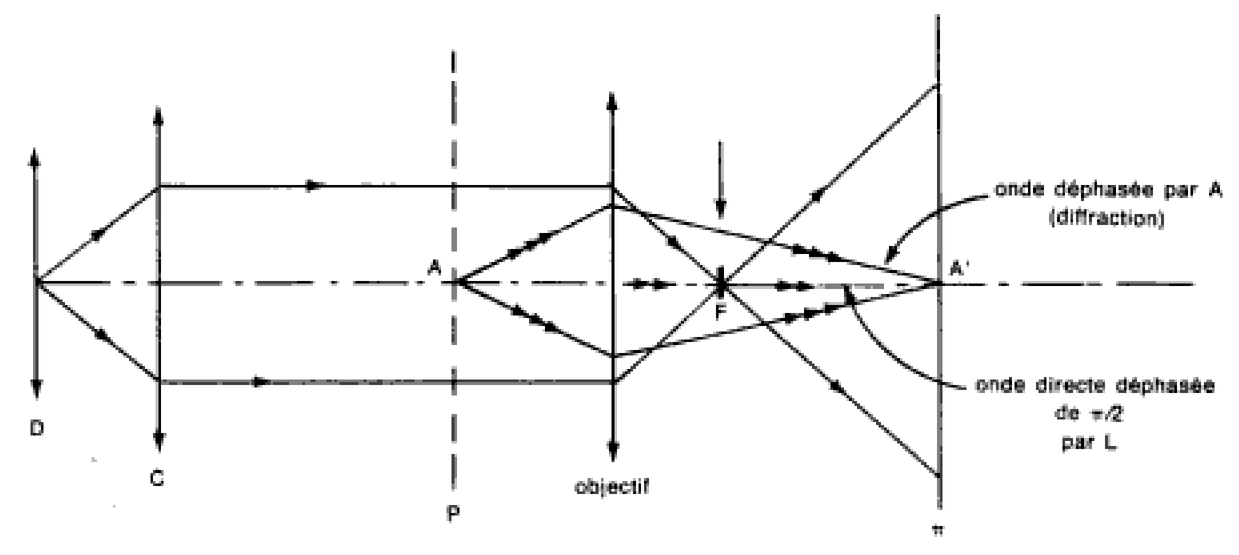


Fig. 6 Principe du microscope à contraste de phase.

L'amplitude résultante en A' sera $(a + a\varphi)$ et il apparaîtra un contraste entre A' et le fond.

Le contraste C est exprimé en fonction de l'éclairement :

$$C = \left| \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{A'}}{\varepsilon_0} \right|$$

avec

$\varepsilon_0 = a^2$: éclairement du fond

$\varepsilon_{A'} = (a + a\varphi)^2$: éclairement du point A'.

$$C = |2\,\varphi| \,.$$

L'objet devient visible si C est supérieur à 0,1.

3.3. APPAREILLAGE

La lame de phase (L) doit couvrir la partie centrale de l'onde directe ; ses dimensions doivent être petites ; elle est placée au foyer image de l'objectif.

Pour avoir davantage de lumière, on remplace la source ponctuelle par une fente annulaire, la lame de phase devant avoir la même forme (anneau de phase).

La lame de phase est montée avec l'objectif, dans le plan focal image (d'où l'existence d'objectifs spéciaux, à contraste de phase).

3.4. APPLICATIONS

– En bactériologie : Observation d'objets de phase tels la spore et les flagelles. Observations de bactéries à l'état frais.

– En parasitologie : Le *Trichomonas vaginalis*, invisible dans une préparation de sérosités vaginales, le devient en microscopie en contraste de phase, le parasite se détache brillant sur fond gris.

4. Le microscope à fluorescence

4.1. PRINCIPE

Un corps est fluorescent lorsque, frappé par une radiation de longueur d'onde λ, il émet une radiation de longueur d'onde λ' supérieure à λ.

La microscopie de fluorescence consiste à observer au microscope des objets fluorescents.

Il y a autofluorescence si l'objet contient des molécules fluorescentes par elles-mêmes. Les porphyrines, par exemple, ont une fluorescence rouge ; souvent les tissus donnent des couleurs variées auxquelles il est difficile de rattacher une substance chimique bien définie.

Dans le cas contraire, l'objet est devenu fluorescent après avoir été coloré par un fluorochrome : un colorant fluorochrome est une molécule qui possède un groupement responsable de la fluorescence (groupement fluorochrome), et un groupement responsable de la fixation sur l'objet (groupement auxochrome). On donne quelques exemples :

– l'isothiocyanate de rhodamine (RITC) qui fluoresce en vert ;
– l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui fluoresce en bleu ;
– l'auramine qui fluoresce en jaune.

L'immunofluorescence est la visualisation d'un complexe Ag-Ac à l'aide d'un Ac conjugué à un fluorochrome (isothiocyanate de fluorescéine). D'une manière générale, la coloration fluorescente doit être sélective ; le bacille tuberculeux est imprégné sélectivement par l'auramine. Comme en microscopie usuelle, on peut utiliser un colorant de fond (souvent pour masquer l'autofluorescence des tissus observés) ou, pour une préparation histologique, une coloration polychromatique.

4.2. TECHNOLOGIE

La technologie de la microscopie de fluorescence a été décrite p. 119 et 120.

4.3. APPLICATIONS

- *Bactériologie*

– Coloration fluorescente des mycobactéries à l'auramine.
– Diagnostic par immunofluorescence de bactéries ; par exemple : diagnostic des *E. coli* entéropathogènes.
– Sérodiagnostic de la syphilis.

- *Parasitologie*

Sérodiagnostic du toxoplasme et du paludisme à *Plasmodium*.

- *Histologie*

- *Minéralogie*

5. Microscope à fond noir

5.1. PRINCIPE

Pour observer des objets que leurs dimensions, ou leur transparence rendent difficilement décelables par les méthodes habituelles, on a recours aux dispositifs à fond noir.

On rend obscur le fond de la préparation en interposant, entre celle-ci et la source lumi-

neuse du microscope, un disque opaque. Les rayons lumineux qui passent à la périphérie du disque sont dirigés de telle sorte qu'ils ne peuvent entrer directement dans l'objectif microscopique. Seuls, peuvent atteindre l'objectif les rayons qui ont été réfléchis, réfractés ou diffractés par les éléments figurés de la préparation. Ces derniers deviennent comme autant de sources lumineuses que l'œil peut observer au travers du microscope.

5.2. APPAREILLAGE

Un certain nombre de solutions ont été proposées pour donner aux rayons lumineux une direction telle qu'ils n'atteignent pas l'objectif.

L'un a été souvent mis en œuvre par les constructeurs de microscope : le *condensateur à miroirs.*

Cet accessoire est formé de deux miroirs sphériques concentriques, le miroir central est convexe, le miroir périphérique est concave.

Le jeu de ces miroirs arrête les rayons directs et ne permet l'accès à l'objectif qu'aux rayons réfléchis, réfractés, diffractés par des objets de la préparation.

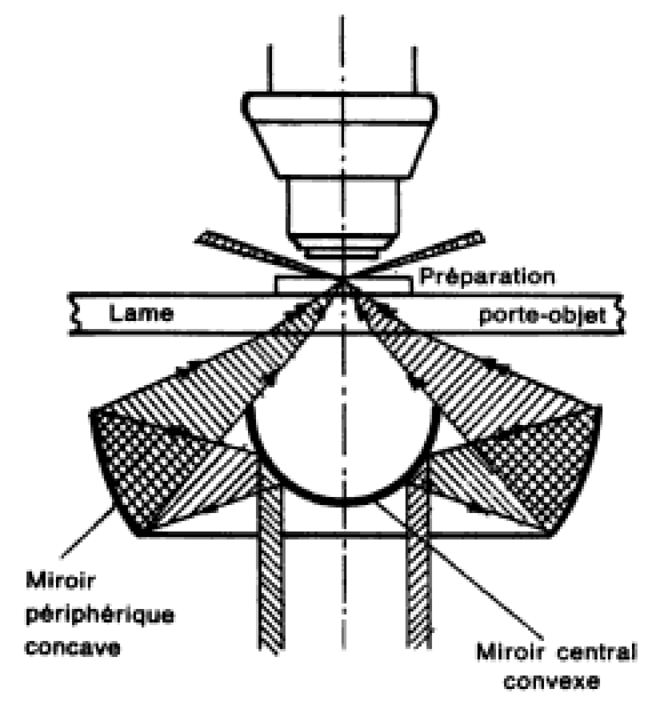


Fig. 9 Eclairage à fond noir.

5.3 APPLICATIONS

Observation des Tréponèmes.

6. Microscope électronique

6.1 PRINCIPE

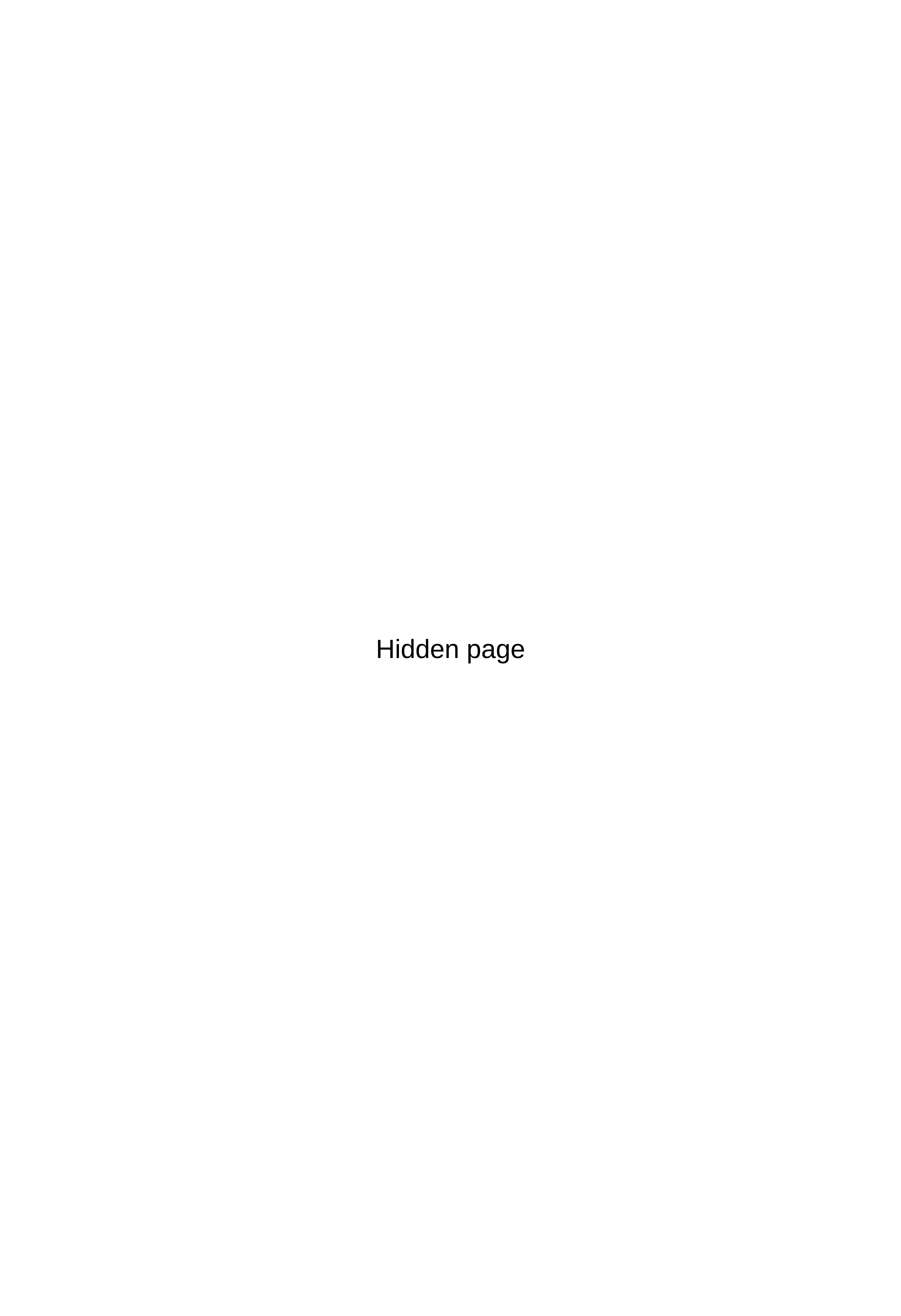
On a vu (§ 1) que, pour augmenter le pouvoir séparateur, c'est-à-dire diminuer la limite de résolution, on pouvait diminuer la longueur d'onde.

En microscopie électronique, la longueur d'onde associée aux électrons est de l'ordre de 5.10^{-3} nm ; elle dépend de la tension accélératrice.

Pour éviter les interactions entre les électrons et des molécules de gaz, il est nécessaire d'opérer dans le vide, c'est-à-dire avec une pression de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} mm Hg.

Les électrons émis par une source (en général un métal chauffé) sont accélérés par une anode (canon à électrons) ; ils forment un faisceau que l'on peut modifier en direction ou en largeur par un système de lentilles électrostatiques ou électromagnétiques, jouant le rôle du condenseur dans le microscope photonique.

Le faisceau d'électrons ayant traversé l'objet subit l'effet d'un système de lentilles électromagnétiques jouant le rôle de l'objectif du



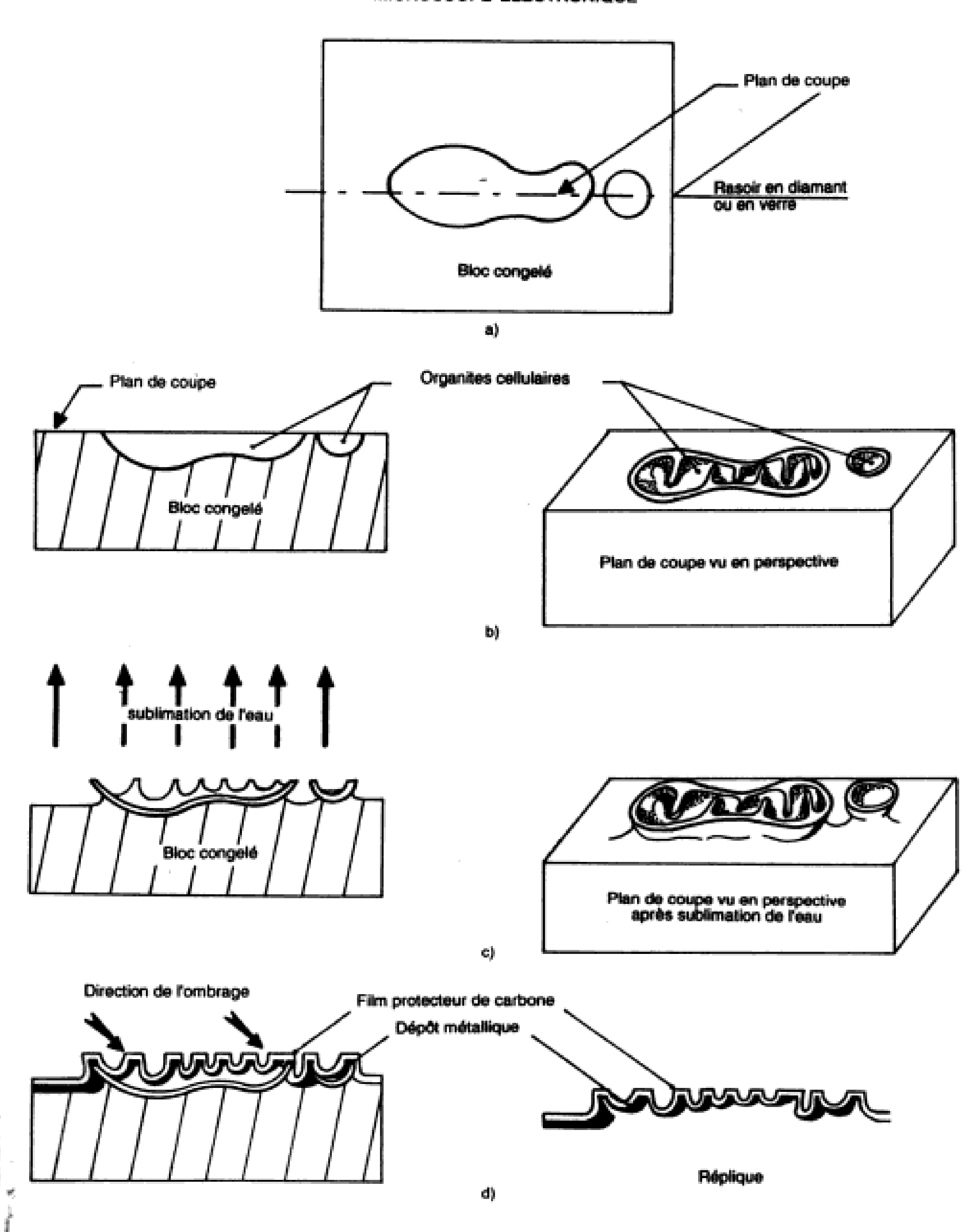
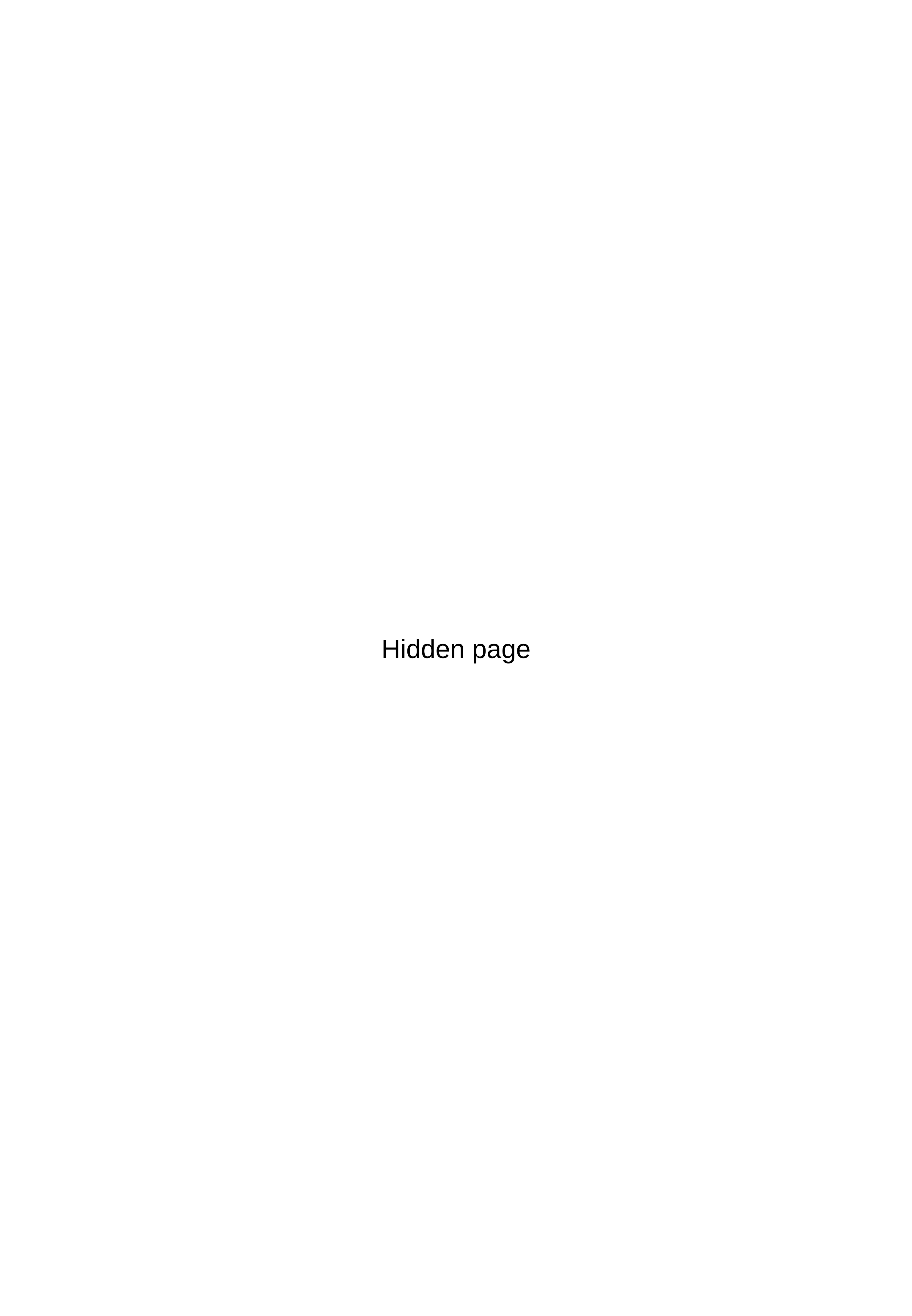


Fig. 13 Cryofracture et cryodécapage.

a) Fracture du bloc congelé.
b) Exposition du plan de fracture.
c) Cryodécapage.
d) Réplication du plan de fracture.


Hidden page

BIOSCIENCES ET TECHNIQUES

Principes des méthodes d'analyse biochimique

Tome 2

Cette nouvelle édition, entièrement réactualisée et complétée, apporte les éléments de connaissance scientifique permettant la théorisation de la pratique des travaux de laboratoire en biochimie.

S'appuyant sur leur expérience, les auteurs décrivent de façon simple les lois physiques, chimiques, biologiques et les applications technologiques sur lesquelles sont fondées la conception des appareils de laboratoire et les méthodes d'analyse.

Les techniques abordées sont transversales, c'est-à-dire non spécialisées vers tel ou tel secteur d'activité et peuvent être appliquées aussi bien en analyses médicales que dans les industries alimentaires ou les bioindustries.

Cl. Audigié†
G. Dupont
F. Zonszain

Cet ouvrage s'adresse autant au technicien supérieur en activité professionnelle, qu'à l'élève ou l'étudiant en formation dans de nombreuses filières technologiques : baccalauréats technologiques F7 et F7', classes préparatoires TB', BTS d'analyses biologiques, biochimie et biotechnologie, DUT de biologie appliquée, DEUST de biologie.

ISBN : 2-7040-0684-9

D. line - paris